



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, A61K 38/17, G01N 33/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/35034</b> <b>(43) Date de publication internationale: 13 août 1998 (13.08.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/00270 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 11 février 1998 (11.02.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/01574 11 février 1997 (11.02.97) FR 97/09587 28 juillet 1997 (28.07.97) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75015 Paris (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> WALDMANN, Rainer [FR/FR]; Chemin de Chense, F-83600 Les Adrets de l'Esterel (FR). BASSILANA, Frédéric [FR/FR]; 15, rue Deville, F-06000 Nice (FR). LAZDUNSKI, Michel [FR/FR]; 21, avenue Colombo, 06000 Nice (FR). CHAMPIGNY, Guy [FR/FR]; 3, place Carrée, F-06560 Valbonne (FR). HEURTEAUX, Catherine [FR/FR]; Résidence Elvira Hills D1, 1187, route de Saint Jean, F-06600 Antibes (FR). LINGUEGLIA, Eric [FR/FR]; 20, boulevard Dubouchage, F-06000 Nice (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> MAMMAL NEURONAL ACID SENSING CATIONIC CHANNEL, CLONING AND APPLICATIONS THEREOF <b>(54) Titre:</b> CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE MAMMIFERE SENSIBLE A L'ACIDITE, SON CLONAGE ET SES APPLICATIONS <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a protein constituting a mammal neuronal amiloride sensing channel and activated by protons, and the nucleic acid molecules coding for this protein. The invention also concerns a method for screening substances capable of modulating the activity of mammal neuronal acid sensing ionic channels.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne une protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons, ainsi que les molécules d'acide nucléique codant cette protéine. L'invention concerne aussi un procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité de canaux ioniques neuronaux de mammifère.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE MAMMIFERE SENSIBLE A L'ACIDITE, SON CLONAGE ET SES APPLICATIONS

5 La présente invention concerne une nouvelle  
famille de canaux ioniques de mammifère, notamment humain,  
sensible à l'acidité. Elle concerne plus particulièrement  
l'identification et la caractérisation moléculaire, chez  
l'homme et le rat, d'un nouveau canal cationique activé  
10 par les protons, dénommé ci-après "ASIC" pour désigner les  
termes anglais "Acid Sensing Ionic Channel". Le canal ASIC  
constitue le premier membre d'un groupe de canaux  
cationiques, appartenant à la famille des canaux sodium de  
dégénérine sensible à l'amiloride (6, 11-14), qui est  
15 activé transitoirement par une acidification  
extracellulaire.

La sensibilité à l'acide est associée à la  
fois à la nociception (1) et à la transduction du goût  
(2). La stimulation de neurones sensoriels par les acides  
20 revêt une grande importance, car l'acidité accompagne de  
nombreuses situations inflammatoires et ischémiques  
douloureuses. La douleur causée par les acides est  
interprétée comme étant médiée par des canaux cationiques  
présents au niveau des neurones sensoriels, et qui sont  
25 activés par les protons (3-5). Les propriétés biophysiques  
et pharmacologiques des canaux ASIC de l'invention sont  
proches de celles des canaux cationiques activés par les  
protons décrits dans les neurones sensoriels (3, 15, 16).  
Toutefois, comme cela apparaîtra dans la description ci-  
après, il n'a été à ce jour jamais décrit de canaux  
30 ioniques activés par un ligand plus simple que les canaux  
ASIC.

La présente invention a donc pour objet une  
35 protéine constituant un canal cationique neuronal sensible  
à l'amiloride et activé par les protons. Plus

COPIE DE CONFIRMATION

particulièrement l'invention concerne la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

De tels dérivés sont ceux dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas les propriétés fonctionnelles et structurelles du canal ASIC, principalement son activation par les protons. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques décrites dans les exemples donnés ci-après qui ont permis de mettre en évidence les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal ASIC.

Un exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine ASIC humaine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, et qui est sensiblement identique à celle du canal ASIC de rat, désigné ASIC1A, représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1.

Un autre exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine constituant un canal cationique de dégénérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCI" (20) ou encore désigné ci-après "ASIC2A" ou "MDEG1" dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3. MDEG a été décrit comme un canal cationique de mammifère sensible à l'amiloride qui est activé par des mutations responsables de neurodégénérescence avec les dégénérines de *C. elegans*. Le canal MDEG est un parent structural du canal ASIC, dont la séquence en acides aminés présente environ 67% d'homologie avec la séquence du canal ionique MDEG. Toutefois, les propriétés

électrophysiologiques de ces deux canaux sont différentes car ils ne sont pas activés par les mêmes changements de pH. Ainsi, la gamme de sensibilité de MDEG ( $EC_{50} = 4,05$ ) est différente de celle de ASIC ( $EC_{50} = 6,2$ ).

5 Il a été montré que le canal MDEG est activé par les mêmes mutations que celles causant une dégénérescence neuronale chez *C. elegans*. Ainsi, comme les mutants de dégénérine de *C. elegans* hyperactifs, les mutants actifs de MDEG sont responsables d'une mort  
10 cellulaire, indiquant que l'acquisition de fonction par ce canal ionique neuronal serait impliquée dans plusieurs formes de dégénérescence neuronale de mammifère et notamment humaine. Mais aucune fonction physiologique normale de MDEG n'était connue jusqu'à la mise en évidence  
15 de son activation par les protons conformément aux canaux cationiques de la présente invention.

D'autres exemples de protéines constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons selon l'invention sont donnés ci-après :

20 - Un canal désigné ASIC1B dont la séquence de 559 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4. ASIC1B est un variant dépissage du canal ASIC1A cloné à partir du cerveau de rat par PCR dégénérée. Les premiers 185 amino  
25 acides sont remplacés par une nouvelle séquence de 218 amino acides qui est soulignée dans la SEQ ID NO : 4.

- Un canal désigné DRASIC dont la séquence de 533 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5. DRASIC a  
30 été cloné à partir des neurones sensoriels de rat en utilisant une séquence partielle dans la banque de données ("Expressed Sequence Tag" avec le numéro d'accèsion W62694). Les propriétés de DRASIC sont les suivantes :

35 - Il est exprimé dans les neurones sensoriels mais pas dans le cerveau.

- Son expression dans les oocytes de Xénope ou dans des cellules de mammifère permet d'enregistrer un courant sodium activé par le proton qui présente deux composantes : une composante s'activant et s'inactivant rapidement et une composante s'activant plus lentement et ne s'inactivant pas. Les deux composantes sont sélectives pour le  $\text{Na}^+$ . Un canal cationique activé par le proton et ne s'inactivant pas a été impliqué dans la sensation de douleur prolongée causée par une acidose.

L'invention concerne aussi un canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons. Avantagusement, ladite seconde protéine est aussi une protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention. A titre d'exemple d'une telle association, on peut citer l'association de la protéine du canal ASIC1A ou ASIC2A ou DRASIC avec la protéine du canal MDEG1, permettant de former un canal hybride présentant une troisième gamme de sensibilité au pH (avec ASIC :  $\text{EC}_{50} = 4,8$ ). Un autre exemple d'un tel canal hybride est l'association de la protéine des canaux ASIC1A, ASIC1B, MEDG1 ou DRASIC avec la protéine du canal MDEG2.

MDEG2 est un canal qui a été cloné à partir du cerveau de rat en utilisant une séquence partielle de souris accessible dans les banques de données ("Expressed Sequence Tag avec le numéro d'accension W50528") et dont la séquence de 563 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6.

MDEG2 est un variant d'épissage de MDEG1. Les premier 185 amino acides sont remplacés par une nouvelle séquence de 236 amino acides qui est soulignée dans la SEQ ID NO : 6. MDEG2 est exprimé dans le cerveau

et dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale.

5 MDEG2 exprimé seul dans les oocytes de Xénope ou dans des cellules de mammifères ne forme pas un canal cationique activé par le proton. Néanmoins, il peut s'associer avec MDEG1 ou DRASIC pour former des canaux hétéromultimériques activés par le proton avec des propriétés modifiées :

10 - Le pH d'activation du canal formé après la co-expression de MDEG1 et MDEG2 est différent. Après expression dans les cellules COS, le courant n'a pas atteint sa valeur maximale à pH 3 alors que le courant induit par MDEG1 seul sature à un pH compris entre 4,5 et 4,0.

15 - Les cinétiques d'inactivation et la sélectivité ionique du canal formé après la co-expression de MDEG1 et MDEG2 sont clairement différentes de celles de MDEG1 seul. Un courant s'inactivant lentement et peu sélectif pour le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup> apparaît.

20 - Le courant sodique soutenu obtenu après expression de DRASIC devient non sélectif (il ne différencie plus le sodium et le potassium) quand MDEG2 est co-exprimé avec DRASIC. Cette nouvelle propriété est similaire à celle du canal cationique activé par le proton  
25 qui a été impliqué dans la sensation de douleur prolongée causée par une acidose. Il est très probable que DRASIC et MDEG2 fassent partie de ce canal.

30 Les homologues de séquences en acides aminés des protéines constituant les canaux ASIC1A, ASIC1B, cités selon l'invention sont données dans la tableau 1 ci-dessous.

35

Tableau 1

Canaux	ASIC 1B	ASIC 1A	MEDG2	MDEG1	DRASIC
ASIC1B	100	80	56	61	52
ASIC1A		100	59	68	53
MDEG2			100	78	48
MDEG1				100	51
DRASIC					100

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique de l'invention et/ou contre un canal hybride ci-dessus, peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal ASIC et/ou ses dérivés.

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC est celle représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Une autre molécule d'ADN selon l'invention est celle représentée dans la liste de



séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2 ou sous le numéro SEQ ID NO : 3, ou leur séquence complémentaire.

5 Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC1B est celle de 3647 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement l'invention concerne la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquence en annexe  
10 sous le numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN codant pour la protéine DRASIC est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5 ou sa  
15 séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine MDEG2 est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6 ou sa séquence complémentaire.

20 L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine  
25 constituant un canal ionique selon l'invention. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme  
30 du métier.

A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine constituant un canal cationique selon l'invention consiste :

35 - à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal cationique,

5 - à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques de l'invention.

A titre d'exemple, un procédé d'expression d'un canal ionique selon l'invention consiste :

10 - à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans une cellule,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression de canaux ioniques de l'invention.

15 L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

20 Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agit de tout vecteur comme un plasmide.

25 L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les canaux ASIC et/ou ses dérivés comme MDEG obtenues conformément aux procédés précédents. Ces cellules sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût. Ce criblage est effectué en mettant en contact des  
30 quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant les canaux ASIC, puis en mesurant, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux. Des techniques électrophysiologiques permettent également ces études et  
35 font aussi l'objet de la présente invention dès lors qu'elles mettent en oeuvre les canaux ASIC ou leurs

dérivés. Ces criblages permettent d'identifier de nouveaux médicaments utiles dans le traitement ou la prévention de la douleur. Ils permettent également de rechercher des agents modulateurs du goût acide. En outre, ils permettent de rechercher des bloqueurs qui sont susceptibles d'inhiber des neurodégénérescences provoquées par hyperexpression de ces canaux. Ces médicaments, isolés et détectés grâce aux procédés ci-dessus, font également partie de l'invention. Les canaux ASIC ont en effet des propriétés de sélectivité ionique, notamment en ce qui concerne leur perméabilité sélective au sodium, potassium et calcium, qui les destinent à avoir des propriétés excitotoxiques lorsqu'ils sont hyperstimulés.

Une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant la perception douloureuse de l'acidité qui intervient dans les maladies inflammatoires, les ischémies et dans un certain nombre de tumeurs. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'invention.

Une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine constituant un canal ASIC ou un dérivé de celui-ci, ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux ASIC, sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux sur-exprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connues de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux ASIC.

Les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite

molécule sont donc susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une déficience des canaux ASIC au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un  
5 médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par lesdites molécules pour le traitement de pathologie impliquant les canaux ASIC et leurs dérivés.

10 Outre la propriété d'être activé par les protons et les applications décrites ci-dessus qui en résultent dans le domaine de la perception de l'acidité, le canal ASIC, du fait de sa parenté structurale avec le canal MDEG, est susceptible de se comporter comme une  
15 dégénérine neuronale à la suite de mutation.

La mort de certains neurones est caractéristique de plusieurs types de dégénérescences neuronales telles que les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'ataxie cérébelleuse. Seuls quelques gènes  
20 déficients sont connus et plusieurs restent encore à identifier. Le réseau neuronal primitif du nématode *C. elegans* constitue un bon modèle du développement et de la mort neuronal. La dégénérescence héréditaire chez *C. elegans* peut être due à des mutations des dégénérines deg-  
25 1, mec-4 et mec 10. Les homologues avec les sous-unités du canal sodium sensible à l'amiloride, le produit d'expression fonctionnel des chimères mec-4 du canal sodium épithélial, suggèrent que les dégénérines sont des  
30 canaux ioniques dont l'acquisition de fonction est la cause de dégénérescence neuronale.

La présente invention concerne donc aussi les applications du canal ASIC pour l'étude de ces modifications pathologiques susceptibles de conduire à des  
35 dégénérescences. Les techniques mises en oeuvre pour ces applications, par exemple pour le criblage de drogues,

sont similaires à celles décrites précédemment pour la recherche d'agents modulateurs du goût ou d'analgésiques.

En outre, une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC, un agoniste ou un antagoniste de celle-ci, peuvent être aussi utiles pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant une dégénérescence neuronale cérébrale. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une de ces protéines éventuellement associée à un véhicule physiologiquement acceptable.

Plus particulièrement, l'invention concerne une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal ionique et/ou un canal hybride selon l'invention pour la préparation d'un médicament capable de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût, chez un sujet humain ou animal.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence et à la caractérisation du canal ASIC, et dans laquelle il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

- SEQ ID NO : 1 représente la séquence de 526 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence de l'ADNc de rat.
- SEQ ID NO : 2 représente la séquence partielle de 514 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence partielle de l'ADNc humain.
- SEQ ID NO : 3 représente la séquence de 512 acides aminés de la protéine du canal MDEG déduite de la séquence de l'ADNc humain.
- SEQ ID NO : 4 représente la séquence de 559 acides aminés de la protéine du canal ASIC1B ainsi que la

séquence d'une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour cette protéine.

5 -SEQ ID NO : 5 représente la séquence de 533 acides aminés de la protéine du canal DRASIC et la séquence d'ADN codant pour cette protéine.

-SEQ ID NO : 6 représente la séquence de 563 acides aminés de la protéine du canal MDEG2 ainsi que la séquence d'une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour cette protéine.

10 - La figure 1 représente l'alignement des séquences des protéines ASIC de rat (en haut) et humain (en bas) des séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2. La comparaison de ces séquences fait apparaître l'absence de 14 acides aminés au début de la phase codante humains par rapport à celle du rat.

15 La figure 2 représente la comparaison de la séquence de la protéine du canal ASIC avec la séquence d'autres canaux ioniques :

20 - MDEG (14), un canal cationique de mammifère qui est activé par des mutations responsables de neurodégénérescences avec les dégénérines de *C. elegans*.

- FaNaCh (10), un peptide d'un canal sodium de *Helix aspersa* qui est activé par la FMRFamide.

25 - La dégénérine MEC-4 (12) de *C. elegans*.

Dans cette figure, les résidus identiques ou similaires à ceux de ASIC sont imprimés respectivement en blanc sur fond noir et en noir sur fond gris. Les régions supposées transmembranaires (MI, MII) d'ASIC sont marquées par des barres noires.

30 La figure 3 représente l'arbre phylogénétique des protéines des sous unités  $\alpha$ NaCh,  $\beta$ NaCh,  $\gamma$ NaCh,  $\delta$ NaCh du canal sodium sensible à l'amiloride et des dégénérines MEC-4, MEC-10 et DEG-1 de *C. elegans*.

35 La figure 4 représente la topologie qui est proposée pour cette dernière famille de canaux ioniques (30).

La figure 5 montre les propriétés biophysiques du canal ASIC1 activé par les protons.

5 - En a : les courants macroscopiques entrant enregistrés à -70 mV après des rapides changements du pH de pH 7,4 à pH 6.

10 - En b : La courbe dose réponse du pH extracellulaire. Le pH initial était de 7,4 et les points représentent les valeurs moyennes de 6 expériences. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques à -70 mV.

15 - En c : les relations Q-V des patch "outside-out" avec 140 mM de  $\text{Na}^+$  (■) ou de  $\text{Li}^+$  (•) dans la solution du bain. Q est la charge transportée durant la transition de pH acide. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques dans un milieu contenant du  $\text{Na}^+$ .

- En d : les courants activés par les protons  $\text{H}^+$  enregistrés à différents potentiels dans un patch "outside-out" dans un milieu contenant du  $\text{Na}^+$ .

20 - En e : les relations moyennes i-V mesurées à partir de patch "outside-out" avec 140 mM de  $\text{Na}^+$  (■), 140 mM de  $\text{Li}^+$  (•) ou 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ( ), en tant qu'ions perméables majoritaires dans les solutions externes ; les potentiels d'inversion étaient respectivement de 65 mV, 58 mV et -34 mV.

25 - En f : le courant de protons à travers le canal ASIC1. Les relations entre le pic de courant et le voltage ont été mesurées à partir de patch "outside-out" dans une solution de  $\text{Na}^+$  libre,  $\text{Ca}^{2+}$  libre avec des pipettes contenant une solution de  $\text{K}^+$  libre, à pH 4 (•) et  
30 à pH 3 (■). ( ) représentent les résultats obtenus dans les mêmes conditions que (■) mais avec du KCl dans la pipette. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques enregistrées dans les conditions ( ).

35 La figure 6 montre l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'amiloride sur le courant ASIC.

- En a : les courants activés par les protons  $H^+$  enregistrés à différents potentiels membranaires à partir d'un patch outside-out avec 1,8 mM de  $Ca^{2+}$  dans une solution de  $Na^+$  libre ; les courants se sont inversés à -35 mV.

- En b : Les relations Q-V moyennes à partir d'un patch outside-out enregistrées dans des solutions de  $Na^+$  libre contenant 1,8 mM de  $Ca^{2+}$  (o, potentiel d'inversion -34 mV) ou 0,1 mM de  $Ca^{2+}$  (•, potentiel d'inversion -80 mV).

- En c : L'effet du  $Ca^{2+}$  externe sur le pic macroscopique de courant entrant enregistré à -70 mV et activé par un changement rapide de pH de pH 7,4 à pH 6. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques. Les points représentent les valeurs moyennes  $\pm$  se de 5 oocytes.

- En d : L'effet de l'amiloride sur les courants activés par les protons  $H^+$  enregistré à 0 mV à partir d'un patch outside-out.

- En e : L'inhibition du courant macroscopique (induit par un changement de pH de pH 7,4 à pH 6) à -70 mV par l'amiloride et dérivés. Les points représentent les valeurs moyennes  $\pm$  se de 5 oocytes.

La figure 7 montre la distribution tissulaire de l'ARNm du canal ASIC.

- En a : L'analyse en Northern blot de l'expression ARNm du canal ASIC dans des tissus humains.

- En b : L'analyse en RT-PCR de l'expression de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau de rat et dans le ganglion de la racine dorsale (DRG). (+), (-) représentent respectivement les échantillons avec ou sans reverse transcriptase. Des sections d'un gel d'agarose révélé au bromure d'éthidium 1%. Les flèches indiquent la taille escomptée (657 pb) du produit de PCR.

La figure 8 représente l'hybridation *in situ*.



- En a et b : L'hybridation de sections de 6 µm d'un ganglion de la racine dorsale d'un rat âgé de 3 mois avec la sonde E marquée à la digoxigénine. En a : Une microphotographie à faible pouvoir éclairant (grossissement de 30 fois). En b : Une image à haute résolution (grossissement de 80 fois) de a. On note le marquage intense des neurones de petit diamètre (flèches). Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec les sondes A, C et D.

- En c : La distribution de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau d'un rat adulte analysée par hybridation in situ avec l'oligonucléotide antisens C. Des résultats identiques ont été obtenus avec l'oligonucléotide B. Les couleurs indiquent l'abondance (rouge : haute expression ; bleu : non détectable). Les abréviations utilisées dans la figure sont les suivantes : Cer = Cerebellum ; Hip = Hypocampe ; OB = Bulbe olfactif ; Cx = Cortex.

## I - Matériels et Méthodes.

### 1) Clonage du canal ASIC.

Les séquences conservées de la famille de canaux ioniques ASIC ont été utilisées pour préparer les amorces PCR de séquences suivantes :

TTYCCIGCIRTIACIITNTGYAAY, et  
CAIARICCIAIITGNCCNCCDAWRTC.

Une banque d'ADNc de cerveau de rat (Stratagène #936515) a été hybridée avec le produit de PCR de 1 kB de cerveau de rat et des clones partiels ont été isolés. L'extrémité 5' de l'ADNc (202 bp) a été isolée par PCR après une ligation adaptée à l'ADNc double brin.

### 2) Electrophysiologie.

0,25 ng d'ARNc a été injecté dans des oocytes de *Xenopus laevis* et les microélectrodes

d'enregistrement pour le voltage imposé et pour le patch-clamp ont été mises en place deux jours après l'injection. Les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient :  
140 mM KCl (ou NMDG), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 7,4 (avec KOH). Les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM NaCl (ou LiCl ou NMDGCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, pH 7,4 (ajusté avec HCl, NaOH, LiOH ou TMAOH). Les changements rapides de pH depuis le pH initial ont été obtenus par perfusion avec une solution de bain ajustée aux pH indiqués dans les figures. L'acidification intracellulaire des oocytes a été réalisée en injectant 50 nl de la solution interne à pH2 ou par perfusion et retrait d'un milieu de bain contenant 20 mM NH<sub>4</sub>Cl. Aucun des courants enregistrés n'était contaminé par le courant Ca<sup>2+</sup> sensible au Cl<sup>-</sup> de l'oocyte de *Xenopus*. Les données ont été échantillonnées à 2 kHz et filtrées à 500 Hz pour l'analyse (Logiciel Biopatch).

3) Analyse Northern Blot, RT-PCR et hybridation in situ.

Le Northern blot a été obtenu auprès de la Société Clontech (Palo Alto, Ca) et contenait environ 2 µg d'ARN poly(A+) par ligne. Le blot a été hybridé avec un fragment du clone partiel humain (correspondant aux bases 270 à 764 du clone de rat) marqué au <sup>32</sup>P, à 65°C dans 6xSSC. Pour l'analyse RT-PCR, 5 µg de l'ARN total de cerveau de rat et 3 µg de ganglion de la racine dorsale ont été reverse transcrits et 1/30 de l'échantillon a été amplifié par 30 cycles de PCR avec les amorces de séquences ci-dessous :

ATTGCTCTTCCCATCTCTAT, et  
TTCAAGGCCCATACCTAAGT.

Les contrôles négatifs ont été traités de façon identique, à l'exception de la reverse transcriptase qui n'a pas été ajoutée. Les oligonucléotides antisens correspondant aux bases 70 à 114 (A), 215 à 248 (B), 1821 à 1859 (C), 1896 à 1940 (D) et l'ADN double brin correspondant aux bases 1685 à 2672 ont été utilisés pour les hybridations *in situ*. Les sections de cerveau de rat adulte ont été hybridées avec les oligonucléotides B ou C dont l'extrémité était marquée au  $^{32}\text{P}$ , pour une nuit à 37°C dans 50% formamide, 2xSSC, puis lavées à température ambiante dans 1xSSC. Le signal a été aboli par un excès 500 fois d'oligonucléotides non marqués. Les sections de ganglion de la racine dorsale ont été hybridées avec les oligonucléotides A, C ou D marqués par la digoxigénine(DIG)-dUTP et avec la sonde E marquée par DIG-d-UTP par PCR. Le marquage des sondes, la préparation des échantillons, l'hybridation et la visualisation des acides nucléiques DIG avec la phosphatase alcaline conjuguée à des anticorps anti-DIG ont été réalisés conformément aux protocoles du fournisseur (Boehringer Mannheim).

#### 4) Analyse informatique.

L'alignement de séquences et l'arbre phylogénétique (substitution Kimura, option UPGMA) ont été réalisés avec le logiciel GCG (Genetics Computer Group, Madison WI).

## II - Résultats.

L'ADNc de 35 kb isolé de cerveau de rat code pour une protéine de 526 acides aminés qui présente, comme montré sur la figure 2, des homologies avec tous les membres clonés de la famille des canaux sodium de dégénéérine sensibles à l'amiloride.

Comme montré sur la figure 5, l'expression de l'ARNc dans des oocytes de *Xenopus* a induit un courant

entrant activé par les protons  $H^+$ . Les propriétés biophysiques et la pharmacologie du canal ASIC sont proches de celles décrites pour les canaux cationiques activés par les protons des neurones sensoriels (3, 15, 16). Une baisse du pH extracellulaire au dessous d'un pH de 6,9 active un courant entrant rapidement élevé et désensibilisé (figure 5 a et b). Ce canal est activé par les protons extracellulaires, puisque, comme montré sur la figure 5 (c et d), l'application d'un acide sur la face extracellulaire de patch outside-out active le canal. L'acidification intracellulaire d'oocytes et l'acidification de la face intracellulaire de patch outside-out n'active pas le canal ASIC ni n'altère le courant ASIC induit par les protons extracellulaires.

L'analyse des courbes I-V de la figure 5 (c et e) enregistrées avec différents cations extracellulaires montre que  $Na^+$  est l'ion perméable majoritaire (canal de conductance simple 14,3 pS). Comme le canal ionique sensible aux protons des neurones sensoriels (15, 16), le canal ASIC discrimine faiblement entre les cations (figure 5 c, e, f). En effet, le canal est aussi perméable à  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $H^+$ , avec des rapports  $pNa^+/pLi^+ = 1,3$  (figure 5 c, e),  $pNa^+/pK^+ = 13$  (figure 5 c, e),  $pNa^+/Ca^{2+} = 2,5$  (figure 5 e) et  $pNa^+/H^+ = 0,8$  (figure 5 f). La perméabilité au  $Ca^{2+}$  de ASIC pourrait être un chemin d'entrée voltage indépendant de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Un courant entrant de  $Ca^{2+}$  dans la cellule à travers les canaux ASIC peut être détecté en l'absence de  $Na^+$  extracellulaire (figure 6 a, b). Comme indiqué sur la figure 5 (e) la conductance unitaire pour  $Ca^{2+}$  était de 5,2 pS. En présence de 140 mM de  $Na^+$  extracellulaire, l'augmentation des concentrations en  $Ca^{2+}$  externe, a diminué l'amplitude du courant activé par les protons (figure 6c), démontrant ainsi que  $Ca^{2+}$  inhibe la perméabilité au  $Na^+$ . Un blocage par le  $Ca^{2+}$  externe est caractéristique du  $I(H^+)$  des neurones sensoriels (17). Le

courant entrant activé par  $H^+$  dans les neurones sensoriels est inhibé par l'amiloride (18) et l'éthylisopropylamiloride (EIPA) (19). Comme montré à la figure 6 (d, e) le canal ASIC présente la même pharmacologie et est bloqué de façon réversible ( $K_d = 10$   $\mu M$ ) par l'amiloride et ses dérivés benzamil et EIPA.

Par ailleurs, la protéine du canal ASIC présente environ 67% d'homologie de séquences avec le canal ionique de dégénéérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCl" (20). Toutefois, les propriétés électrophysiologiques de ces deux clones exprimés dans les oocytes de *Xenopus* sont clairement différentes :

- Comme montré sur la figure 5a, le canal MDEG n'est pas activé par les mêmes changements de pH que le canal ASIC.

- La substitution du résidu glycine en position 430 de MDEG par un acide aminé encombrant acide, comme la valine ou la phénylalanine active le canal (14), tout comme la mutation de l'alanine en position 704 de la dégénéérine MEC-4 cause une neurodégénérescence chez *C. elegans* (12). Des mutations identiques d'ASIC (glycine en position 431 remplacée par la valine ou la phénylalanine) n'entraînent pas d'activité et les mutants ne peuvent pas être activés par les protons.

Les canaux cationiques activés par les protons ont été décrits dans les neurones sensoriels mais aussi dans les neurones du système nerveux central (21). La distribution tissulaire de l'expression de l'ARNm du canal ASIC est en accord avec cette observation. Comme rapporté dans la figure 7a, un transcrit de 4,3 kb a été détecté dans le cerveau par analyse en Northern blot, et les résultats de la RT-PCR rapportés à la figure 7b montrent que le ganglion de la racine dorsale exprime l'ARNm de ASIC. La figure 8 (a,b) montre que l'ARNm de ASIC est bien exprimé dans les petits neurones du ganglion de la racine dorsale, ce qui supporte le fait que ASIC est

le canal cationique activé par les protons rapidement désensibilisant décrit dans les neurones sensoriels nociceptifs. Alors que la présence de canaux cationiques activés par les protons dans le ganglion de la racine dorsale est en accord avec leur fonction de détecteur de l'acidité dans la nociception, leur rôle dans le cerveau reste à établir. Les résultats d'hybridation *in situ* de la figure 8c montrent une expression large et hétérogène de l'ARNm du canal ASIC. Les niveaux d'expression les plus élevés ont été observés dans le bulbe olfactif principal, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'habenula, le noyau amygdaloïde basolatéral et le cerebellum. L'activité synaptique s'accompagne de changements du pH extracellulaire (22, 23) et les changements localisés rapides de pH dans ou à proximité de la fente synaptique sont sensiblement plus saturés et forts que les fluctuations macroscopiques du pH rapportées.

Les canaux cationiques activés par les protons sont les seuls canaux ioniques connus qui sont directement activés par un changement du pH et il a été envisagé que les fluctuations extracellulaires du pH jouent un rôle neuromodulateur (23). L'expression de canaux cationiques dans le cerveau supporte en outre l'hypothèse que les fluctuations de pH ne sont pas seulement une activation neuronale par un produit, mais davantage un chemin de communication dans le système nerveux central.

Outre les canaux cationiques activés par les protons rapidement inactivés, il a été rapporté la présence dans les neurones sensoriels de canaux cationiques activés par les protons présentant des cinétiques plus lentes (4, 24). Les canaux cationiques activés par les protons forment probablement, comme d'autre canaux cationiques activés par un ligand (25, 26), une famille de canaux cationiques où différentes sous-unités ou combinaisons de sous-unités constituent les

canaux avec diverses propriétés pharmacologiques et biophysiques.

La sensation de l'acidité n'est pas uniquement impliquée dans la nociception, mais est aussi associée à la transduction du goût (2). Les stimulations acides activent les canaux cationiques activés par les protons dans les cellules du goût (2, 27) et l'amiloride inhibe la perception du goût acide (2). Aussi, les données tant physiologiques que pharmacologiques indiquent que ASIC et d'autres membres de cette famille sont impliqués dans la transduction du goût. Il est en effet particulièrement frappant que la même classe de canaux ioniques soit associée à différentes facettes de la perception sensorielle :

- Les canaux sodium sensibles à l'amiloride sont associés à la transduction du goût salé (2).

- Les dégénérines de *C. elegans* sont impliquées dans la mécanotransduction et ont été proposées comme formant des canaux ioniques mécanosensibles (28, 29).

- les canaux ASIC sont impliqués dans la nociception et dans la transduction du goût acide.

Le clonage du canal ASIC permet de disposer d'un nouvel outil d'investigation de ce groupe de canaux ioniques et de développer des bloquants spécifiques trouvant leur utilisation notamment comme analgésiques.

Liste des références

1. Rang, H.P., Bevan, S. & Dray, A. *Br. Med. Bull.* 47, 534-548 (1991).
2. Lindemann, B. *Physiol. Rev.* 76, 718-766 (1996).
3. Krishtal, O.A. & Pidoplichko, V.I. *Neuroscience* 6, 2599-2601 (1981).
4. Bevan, S. & Geppetti, P. *Trends Neurosci.* 17, 509-512 (1994).
5. Akaike, N., Krishtal, O.A. & Maruyama, T. *J. Neurophysiol.* 63, 805-813 (1990).
6. Canessa, C.M., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* 361, 467-470 (1993).
7. Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* 367, 463-467 (1994).
8. Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Febs Lett.* 318, 95-99 (1993).
9. Lingueglia, E., Renard, S., Waldmann, R., Voilley, N., Champigny, G., Plass, H., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 13736-13739 (1994).
10. Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Nature* 378, 730-733 (1995).
11. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 27411-27414 (1995).
12. Driscoll, M. & Chalfie, M. *Nature* 349, 588-593 (1991).
13. Huang, M. & Chalfie, M. *Nature* 367, 467-470 (1994).
14. Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 271, 10433-10434 (1996).
15. Kovalchuk Yu, N., Krishtal, O.A. & Nowycky, M.C. *Neurosci. Lett.* 115, 237-242 (1990).
16. Konnerth, A., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* 386, 603-633 (1987).
17. Davies, N.W., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* 400, 159-187 (1988).
18. Korkushko, A. O. & Krishtal, O.A. *Neirofiziologiya* 16, 557-561 (1984).
19. Grantyn, R., Perouansky, M., Rodriguez-Tebar, A. & Lux, H.D. *Dev. Brain Res.* 49, 150-155 (1989).



20. Price, M.P., Snyder, P.M. & Welsh, M.J. *J. Biol. Chem.* 271, 7879-7882 (1996).
21. Akaike, N. & Ueno, S. *Prog. Neurobiol.* 43, 73-83 (1994).
22. Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N. & Smirnoff, S.V. *Brain Res.* 436, 352-356 (1987).
23. Chesler, M. & Kaila, K. *Trends Neurosci.* 15, 396-402 (1992).
24. Bevan, S. & Yeats, J. *J. Physiol.* 433, 145-161 (1991).
25. Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. & Surprenant, A. *Nature* 377, 432-435 (1995).
26. Barnard, E.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 305 - 309 (1996).
27. Okada, Y., Miyamoto, T. & Sato, T. *J. Exp. Biol.* 187, 19-32 (1994).
28. Liu, J., Schrank, B. & Waterston, R. *Science* 273, 361 (1996).
29. Waldmann, R., Champigny, G. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 11735-11737 (1995).
30. Renard, S., Lingueglia, E., Voilley, N., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 12981-12986 (1994).

## LISTE DE SÉQUENCES.

NOMBRE DE SÉQUENCES : 6

5      INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:1 :

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 3562 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

10 C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

15

ix) CARACTÉRISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC

B) LOCALISATION : 123 .. 1700

## 20      xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:1 :

CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACAGAAC CTGCGCCTGT 60

GCCTGTGCCT GTGCCTGTGC CTGTTTGAGA GCTGGAGACA CAGAAGGATC CCCTTGGCAA 120

25

GG ATG GAA TTG AAG ACC GAG GAG GAG GAG CTG GGT GGT GTC CAG CCG 167

Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro  
1 5 10 15

30 GTG AGC ATC CAG GCT TTC GCC AGC AGC TCC ACG CTG CAT GGT CTT GCC 215

Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala  
20 25 30

35 CAC ATC TTC TCC TAT GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG GCC 263

His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala  
35 40 45

CTG TGC TTC CTG GGT TCG CTG GCC GTC CTG CTG TGT GTG TGC ACT GAG 311

Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu  
50 55 60

40

CGT GTG CAG TAC TAC TTC TGC TAT CAC CAC GTC ACC AAG CTT GAC GAA 359

Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp Glu  
65 70 75

45

GTG GCT GCC TCC CAG CTC ACC TTC CCT GCT GTC ACA CTG TGC AAT CTC 407

Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu  
80 85 90 95

50 AAT GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAC CAT GCT 455

Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His Ala  
100 105 110

55 GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATC CCG GAC ACA 503

Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp Thr  
115 120 125

	CAG ATG GCT GAT GAA AAG CAG CTA GAG ATA TTG CAG GAC AAG GCC AAC	551
	Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn	
	130 135 140	
5	TTC CGG AGC TTC AAG CCC AAG CCC TTC AAC ATG CGT GAA TTC TAC GAC	599
	Phe Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp	
	145 150 155	
10	AGA GCG GGG CAC GAT ATT CGA GAC ATG CTG CTC TCG TGC CAC TTC CGT	647
	Arg Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg	
	160 165 170 175	
15	GGG GAG GCC TGC ACC GCT GAA GAT TTC AAA GTG GTC TTC ACT CGG TAT	695
	Gly Glu Ala Cys Ser Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr	
	180 185 190	
20	GGG AAG TGT TAC ACA TTC AAC TCG GGC CAA GAT GGG CGG CCA CGG CTG	743
	Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu	
	195 200 205	
25	AAG ACC ATG AAA GGT GGG ACT GGC AAT GGC CTG GAG ATC ATG CTG GAC	791
	Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp	
	210 215 220	
30	ATT CAG CAA GAT GAA TAT TTG CCT GTG TGG GGA GAG ACC GAC GAG ACA	839
	Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu Thr	
	225 230 235	
35	TCC TTC GAA GCA GGC ATC AAA GTG CAG ATC CAC AGT CAG GAT GAA CCC	887
	Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu Pro	
	240 245 250 255	
40	CCT TTC ATC GAC CAG CTG GGC TTT GGT GTG GCT CCA GGT TTC CAG ACG	935
	Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln Thr	
	260 265 270	
45	TTT GTG TCT TGC CAG GAG CAG AGG CTC ATC TAC CTG CCC TCA CCC TGG	983
	Phe Val Ser Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp	
	275 280 285	
50	GGC ACC TGC AAT GCT GTT ACC ATG GAC TCG GAT TTC TTC GAC TCC TAC	1031
	Gly Thr Cys Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr	
	290 295 300	
55	AGC ATC ACT GCC TGC CGG ATT GAT TGC GAG ACG CGT TAC CTG GTG GAG	1079
	Ser Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu	
	305 310 315	
60	AAC TGC AAC TGC CGT ATG GTG CAC ATG CCA GGG GAC GCC CCA TAC TGC	1127
	Asn Cys Asn Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys	
	320 325 330 335	
65	ACT CCA GAG CAG TAC AAG GAG TGT GCA GAT CCT GCC CTG GAC TTC CTA	1175
	Thr Pro Glu Gln Tyr Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu	
	340 345 350	
70	GTG GAG AAA GAC CAG GAA TAC TGC GTG TGT GAG ATG CCT TGC AAC CTG	1223
	Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu	
	355 360 365	

	ACC CGC TAC GGC AAG GAG CTG TCC ATG CTC AAG ATC CCA AGC AAA GCC	1271
	Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala	
	370 375 380	
5	TCC GCC AAG TAC CTG GCC AAG AAG TTC AAC AAA TCG GAG CAG TAC ATA	1319
	Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu Gln Tyr Ile	
	385 390 395	
10	GGG GAG AAC ATT CTG GTG CTG GAC ATT TTC TTT GAA GTC CTC AAC TAT	1367
	Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val Leu Asn Tyr	
	400 405 410 415	
15	GAG ACC ATC GAG CAG AAA AAG GCC TAT GAG ATC GCA GGG CTG TTG GGT	1415
	Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu Gly	
	420 425 430	
20	GAC ATC GGG GGC CAG ATG GGG TTG TTC ATC GGT GCC AGC ATC CTC ACC	1463
	Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr	
	435 440 445	
25	GTG CTG GAA CTC TTT GAC TAT GCC TAC GAG GTC ATT AAG CAC AGG CTG	1511
	Val Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu	
	450 455 460	
30	TGC AGA CGT GGA AAG TGC CAG AAG GAG GCT AAG AGG AGC AGC GCA GAC	1559
	Cys Arg Arg Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp	
	465 470 475	
35	AAG GGC GTG GCG CTC AGC CTG GAT GAC GTC AAA AGA CAC AAT CCC TGC	1607
	Lys Gly Val Ala Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys	
	480 485 490 495	
40	GAG AGC CTC CGA GGA CAT CCT GCC GGG ATG ACG TAC GCT GCC AAC ATC	1655
	Glu Ser Leu Arg Gly His Pro Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile	
	500 505 510	
45	CTA CCT CAC CAT CCC GCT CGA GGC ACG TTT GAG GAC TTT ACC TGC TAA	1703
	Leu Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr Phe Glu Asp Phe Thr Cys *	
	515 520 526	
50	GCCCTCGCAG GCCGCTGTAC CAAAGGCCTA GGTGGGGAGG GCTGGGGGAG CAAGGGGCCC	1763
	CCAACTGCCC CCAGCTACCC TGTGGACTTA ACTGCATTCC TGGTCAGTGG TTCCCTCTTG	1823
55	TCTGTGGTGA GAAAGGAGTC TTGACCATAG AGTCCTCTCC CAGCCTCTAT CCCATCTTTT	1943
	TATTTTAATT TAATCACATT TGCTCTGTAA TATTGCTTGA GGCTGGGGAT CGTGATTTCC	2003
	CCCCAGTTCT TTTATTGTTG AGAATAGTTT TCTCTATTCT GGGTTTCTG TTATTTCAAA	2063
	TGAATCTGCA AATTGCTCTT CCCATCTCTA TGAAGAATTG CGTTGGAATT TTGATGGGGA	2123
	TTGTATTGAA TCTGTAGATT GCCTTTGGTA AGATGGCCAT TTTTACTATG TTAATCCTGC	2183
	CAATTCATGA GCAAGGGAGA TCTTTCTATC TCTGAAATCT ACTTCAGTTT CTTTCTTCAG	2243
	AGACTTGAAG TTCTTGTCAAT AAAAATCTTT TTGGTTAGAG CCACACCAAG GTATTTTATA	2303
	TTGTTTGTGA CTATTGTGAA TGGTGTCAAT TCCCTAATTT CCTTCTCAGC CTACTTATCC	2363

	TTTCAGTAGA GGAAGGCTTC TGATTTGTTT GGGTTAATTT TATACCCAGC TGCTTTGCTA	2423
	AAGTTCTTTA TCAGGTTTAG GTGTTCTCTG GTGGAACTTT TGGGGTCACG TAAGAATACT	2483
5	ATTATATCAT CTGCAAATAG TGATATTTCA CTTCTTCCTT TCCAATTTCT ATCCCTCTGG	2543
	GGACTTTTTC TTCTCTAATT GCTCTGGCTA GGACTTCAAA TTCTATATTG AATAGATAGG	2603
	GAGAGAGTGG GCAGCCTTGT CTAGTTCCTG GTTTTCGTGG GATCGCTTCA AATTTCTCTC	2663
10	CATTTAGTTT GATATTGGCT ACTGGTTTGC TGTATATGGC TTTTACTGTA CTTAGGTATG	2723
	GGCCTTGAAT TCCTGATATT TCCAAGACTT TTAACATGAA GGGGTTTTGA AATTTGCCAA	2783
15	ATGCTTTCTC AGCATCTAAT GAGATGATCA TGTGCCCTCC CCCACCTTG AGTTTGTTTA	2843
	TATAGTGGGT TACATGAAAG GATCATTTCT AATAGTCCAC AAGTCTGCCA AATCTTGCTG	2903
	ATTGTGACTC ATTTCCATAG CAGGCTCTAT AACTTCTCTA ACAGATTGCA TTAAACTCTG	2963
20	CTTGGGGAAG GCATTACCTC TTGGTTGAAG CAATGTTGTA GTTTCTATGC CTGCTGAGTA	3023
	AATAGCCTCA AGTCCAAGTA CTTGCCCAGA CTAATGATCA AACGTATCCA GGAGTTCCAT	3083
25	ACCAGAGATG TACTCTTCTC TCCTTTGAAG TACATTGCTG GAAGAGTAAT TGTGTTTGCT	3143
	AGAGATACTC CTTCGAACTG CAAAAGAAAT CTCTTGGCTA AGCATATAAT CAAGCCTCAG	3203
	GTTTTCTTTT TATTAAATAG CTGCTTGTA GAAAGTGGAC ACTAAGCATA TACCTCAAAG	3263
30	GGAGACAGAA TGACTCTGTG CCTTCACTGA TGGAAAGTCTG GGTACAAAT TACATCAGAA	3323
	GAACCTATCA TAGTGAAACA TCTCATTTCC CTGGTATAAT CCCTTCTAGA AATACACTTG	3383
35	TGACTCTGAA ATGTTATAAT CGTGACAACT AGGCTGTTAC AGATACACCA AGTTAAATTT	3443
	GATAGAGAAA CCAGGCTTGG AGCCTCATGT CCATAGGGCA AGAGGAAGAT GCTGAGTGTT	3503
	TAAGGTGGT TTGAGCGAAG AACAATACCT TGTGTCACAA AATGAAAGG AAAAAAGAAA	3563
40	AAAGGAAAGA AGGAAAGAAA GAGAGAGAAA GAAAAAGAAA GAAAGAAAAA AAAAAAAA	3562

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:2 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

5 A) LONGUEUR : 1620 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC

B) LOCALISATION : 1 .. 1542

15 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:2 :

20	CCG GTG AGC ATC CAG GCC TTC GCC AGC AGC TCC ACA CTG CAC GGC ATG	48
	Pro Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met	
	1 5 10 15	
25	GCC CAC ATC TTC TCC TAC GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG	96
	Ala His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp	
	20 25 30	
30	GCC CTG TGC TTC CTG GGC TCG CTG GCT GTG CTG CTG TGT GTG TGC ACG	144
	Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr	
	35 40 45	
35	GAG CGT GTG CAG TAC TAC TTC CAC TAC CAC CAT GTC ACC AAG CTC GAC	192
	Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp	
	50 55 60	
40	GAG GTG GCT GCC TCT CAG CTT ACC TTC CCT GCT GTC ACG CTG TGC AAC	240
	Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn	
	65 70 75 80	
45	CTC AAC GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAT CAT	288
	Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His	
	85 90 95	
50	GCT GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATA CCA GAC	336
	Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp	
	100 105 110	
55	ACA CAG ATG GCA GAT GAA AAG CAG CTG GAG ATA CTG CAG GAC AAA GCC	384
	Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala	
	115 120 125	
60	AAC TTC CGC AGC TTC AAA CCC AAA CCC TTC AAC ATG CGT GAG TTC TAC	432
	Asn Phe Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr	
	130 135 140	
65	GAC CGA GCT GGG CAC GAC ATT CGA GAC ATG CTG CTC TCC TGC CAC TTC	480
	Asp Arg Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe	
	145 150 155 160	

	CGG GGG GAG GTC TGC AGC GCT GAA GAC TTC AAG GTG GTC TTC ACA CGC	528
	Arg Gly Glu Val Cys Ser Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg	
	165 170 175	
5	TAT GGA AAG TGC TAC ACG TTC AAC TCG GGC CGA AAT GGG CGG CCG CGG	576
	Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Arg Asn Gly Arg Pro Arg	
	180 185 190	
10	CTG AAG ACC ATG AAG GGT GGG ACG GGC AAT GGG CTG GAA ATC ATG CTG	624
	Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu	
	195 200 205	
15	GAC ATC CAG CAG GAC GAG TAC CTG CCT GTG TGG GGG GAG ACT GAC GAG	672
	Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu	
	210 215 220	
20	ACG TCT TTC GAA GCA GGC ATC AAA GTG CAG ATC CAT AGT CAG GAT GAA	720
	Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu	
	225 230 235 240	
25	CCT CCT TTC ATC GAC CAG CTG GGC TTT GGC GTG GCC CCA GGC TTC CAG	768
	Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln	
	245 250 255	
30	ACC TTT GTG GCC TGC CAG GAG CAG CGG CTC ATA TAC CTG CCC CCA CCC	816
	Thr Phe Val Ala Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Pro Pro	
	260 265 270	
35	TGG GGC ACC TGC AAA GCT GTT ACC ATG GAC TCG GAT TTG GAT TTC TTC	864
	Trp Gly Thr Cys Lys Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Leu Asp Phe Phe	
	275 280 285	
40	GAC TCC TAC AGC ATC ACT GCC TGC CGC ATC GAC TGT GAG ACG CGC TAC	912
	Asp Ser Tyr Ser Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr	
	290 295 300	
45	CTG GTG GAG AAC TGC AAC TGC CGC ATG GTG CAC ATG CCA GGG GAT GCC	960
	Leu Val Glu Asn Cys Asn Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala	
	305 310 315 320	
50	CCA TAC TGT ACT CCA GAG CAG TAC AAG GAG TGT GCA GAT CCT GCT CTG	1008
	Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu	
	325 330 335	
55	GAC TTC CTG GTG GAG AAG GAC CAG GAG TAC TGC GTG TGT GAA ATG CCT	1056
	Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr Cys Val Cys Glu Met Pro	
	340 345 350	
60	TGC AAC CTG ACC CGC TAT GGC AAA GAG CTG TCC ATG GTC AAG ATC CCC	1104
	Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met Val Lys Ile Pro	
	355 360 365	
65	AGC AAA GCC TCA GCC AAG TAC CTG GCC AAG AAG TTC AAC AAA TCT GAG	1152
	Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu	
	370 375 380	
70	CAA TAC ATA GGG GAG AAC ATC CTG GTG CTG GAC ATT TTC TTT GAA GTC	1200
	Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val	
	385 390 395 400	

	CTC AAC TAT GAG ACC ATT GAA CAG AAG AAG GCC TAT GAG ATT GCA GGC	1248
	Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly	
	405 410 415	
5	CTC CTG GGT GAC ATC GGG GGC CAG ATG GGG CTG TTC ATC GGG GCC AGC	1296
	Leu Leu Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser	
	420 425 430	
10	ATC CTC ACG GTG CTG GAG CTC TTT GAC TAC GCC TAC GGG GTC ATT AAG	1344
	Ile Leu Thr Val Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Gly Val Ile Lys	
	435 440 445	
15	CAC AAG CTG TGC CGA CGA GGA AAA TGC CAG AAG GAG GCC AAA AGG AGC	1392
	His Lys Leu Cys Arg Arg Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser	
	450 455 460	
20	AGT GCG GAC AAG GGC GTG GCC CTC AGC CTG GAC GAC GTC AAA AGA CAC	1440
	Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His	
	465 470 475 480	
25	AAC CCG TGC GAG AGC CTT CCG GGC CAC CCT GCC GGG ATG ACA TAC GCT	1488
	Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro Ala Gly Met Thr Tyr Ala	
	485 490 495	
30	GCC AAC ATC GTA CCT CAC CAT CCG GCC CGA GGC ACG TTC GAG GAC TTT	1536
	Ala Asn Ile Val Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr Phe Glu Asp Phe	
	500 505 510	
35	ACC TGC TGA GCGCCGACAGG CCGCCGAACC AAAGACCTAG ATGGGGAGGA CTAGGAGAGC	1595
	Thr Cys *	
	514	
	GAGGGGGCCC CCAGCTGCCCT CCTAA	1620



INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:3 :

- i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
- A) LONGUEUR : 1666 paires de base
- 5 B) TYPE : acide nucléique
- C) NOMBRE DE BRINS : double
- D) CONFIGURATION : linéaire
- ii) TYPE DE MOLECULE : ADN
- 10 vi) ORIGINE : homme
- ix) CARACTERISTIQUE
- A) NOM/CLE : MDEG
- B) LOCALISATION : 127 .. 1663
- 15 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:3 :
- |    |   |     |
|----|---|-----|
|    | TCTGGCGCGA TGCTTACCTT GCGTTCTCTC CCCTGAACGT CAAGGTTTAA GCAGAGCCCG | 60  |
| 20 | AGGACTGGGA GCTCTTCTCT GAAATTCGAT CAACCTGAAG CCAGTTGCGG AACTGCACGG | 120 |
|    | GGTCCCG ATG GAC CTC AAG GAA AGC CCC AGT GAG GGC AGC CTG CAA CCT   | 169 |
|    | Met Asp Leu Lys Glu Ser Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Pro           |     |
|    | 1 5 10  |     |
| 25 | TCT AGC ATC CAG ATC TTT GCC AAC ACC TCC ACC CTC CAT GGC ATC CGC   | 217 |
|    | Ser Ser Ile Gln Ile Phe Ala Asn Thr Ser Thr Leu His Gly Ile Arg   |     |
|    | 15 20 25 30   |     |
| 30 | CAC ATC TTC GTG TAT GGG CCG CTG ACC ATC CGG CGT GTG CTG TGG GCA   | 265 |
|    | His Ile Phe Val Tyr Gly Pro Leu Thr Ile Arg Arg Val Leu Trp Ala   |     |
|    | 35 40 45  |     |
| 35 | GTG GCC TTC GTG GGC TCT CTG GCC CTG CTG CTG GTG GAG AGC TCT GAG   | 313 |
|    | Val Ala Phe Val Gly Ser Leu Gly Leu Leu Leu Val Glu Ser Ser Glu   |     |
|    | 50 55 60  |     |
| 40 | AGG GTG TCC TAC TAC TTC TCC TAC CAG CAT GTC ACT AAG GTG GAC GAA   | 361 |
|    | Arg Val Ser Tyr Tyr Phe Ser Tyr Gln His Val Thr Lys Val Asp Glu   |     |
|    | 65 70 75  |     |
| 45 | GTG GTG GCT CAA AGC CTG GTC TTC CCA GCT GTG ACC CTC TGT AAC CTC   | 409 |
|    | Val Val Ala Gln Ser Leu Val Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu   |     |
|    | 80 85 90  |     |
| 50 | AAT GGC TTC CGG TTC TCC AGG CTC ACC ACC AAC GAC CTG TAC CAT GCT   | 457 |
|    | Asn Gly Phe Arg Phe Ser Arg Leu Thr Thr Asn Asp Leu Tyr His Ala   |     |
|    | 95 100 105 110  |     |
| 55 | GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTG GAT GTC AAC CTG CAG ATC CCG GAC CCC   | 505 |
|    | Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asp Val Asn Leu Gln Ile Pro Asp Pro   |     |
|    | 115 120 125   |     |
| 55 | CAT CTG GCT GAC CCC TCC GTG CTG GAG GCC CTG CGG CAG AAG GCC AAC   | 553 |
|    | His Leu Ala Asp Pro Ser Val Leu Glu Ala Leu Arg Gln Lys Ala Asn   |     |
|    | 130 135 140   |     |

		TTC	AAG	CAC	TAC	AAA	CCC	AAG	CAG	TTC	AGC	ATG	CTG	GAG	TTC	CTG	CAC	601
		Phe	Lys	His	Tyr	Lys	Pro	Lys	Gln	Phe	Ser	Met	Leu	Glu	Phe	Leu	His	
				145					150					155				
5		CGT	GTG	GGC	CAT	GAC	CTG	AAG	GAT	ATG	ATG	CTC	TAC	TGC	AAG	TTC	AAA	649
		Arg	Val	Gly	His	Asp	Leu	Lys	Asp	Met	Met	Leu	Tyr	Cys	Lys	Phe	Lys	
			160					165					170					
10		GGG	CAG	GAG	TGC	GGC	CAC	CAA	GAC	TTC	ACC	ACA	GTG	TTT	ACA	AAA	TAT	697
		Gly	Gln	Glu	Cys	Gly	His	Gln	Asp	Phe	Thr	Thr	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	
			175				180					185					190	
15		GGG	AAG	TGT	TAC	ATC	TTT	AAC	TCA	GGC	GAG	GAT	GGC	AAA	CCT	CTG	CTC	745
		Gly	Lys	Cys	Tyr	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	
					195						200					205		
20		ACC	ACG	GTC	AAG	GGG	GGG	ACA	GCC	AAC	GGG	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	793
		Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	
					210					215					220			
25		ATT	CAG	CAG	GAT	GAG	TAC	CTG	CCC	ATC	TGG	GGA	GAG	ACA	GAG	GAA	ACG	841
		Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Trp	Gly	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	
				225					230					235				
30		ACA	TTT	GAA	GCA	GGA	GTG	AAA	GTT	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	TCT	GAG	CCA	889
		Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Ser	Glu	Pro	
				240				245					250					
35		CCT	TTC	ATC	CAA	GAG	CTG	GGC	TTT	GGG	GTG	GCT	CCA	GGG	TTC	CAG	ACC	937
		Pro	Phe	Ile	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	
						255		260				265					270	
40		TTT	GTG	GCC	ACA	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ACA	TAC	CTG	CCC	CCA	CCG	TGG	985
		Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	
					275					280						285		
45		GGT	GAG	TGC	CGA	TCC	TCA	GAG	ATG	GGC	CTC	GAC	TTT	TTT	CCT	GTT	TAC	1033
		Gly	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Val	Tyr	
					290				295						300			
50		AGC	ATC	ACC	GCC	TGT	AGG	ATT	GAC	TGT	GAG	ACC	CGC	TAC	ATT	GTG	GAA	1081
		Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	
				305				310					315					
55		AAC	TGC	AAC	TGC	CGC	ATG	GTT	CAC	ATG	CCA	GGG	GAT	GCC	CCT	TTT	TGT	1129
		Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe	Cys	
				320				325					330					
60		ACC	CCT	GAG	CAG	CAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAG	CCT	GCC	CTA	GGT	CTG	TTG	1177
		Thr	Pro	Glu	Gln	His	Lys	Glu	Cys	Ala	Glu	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	
							335					340					350	
65		GCG	GAA	AAG	GAC	AGC	AAT	TAC	TGT	CTC	TGC	AGG	ACA	CCC	TGC	AAC	CTA	1225
		Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Tyr	Cys	Leu	Cys	Arg	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	
					355						360					365		
70		ACC	CGC	TAC	AAC	AAA	GAG	CTC	TCC	ATG	GTG	AAG	ATC	CCC	AGC	AAG	ACA	1273
		Thr	Arg	Tyr	Asn	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	Ser	Lys	Thr	
					370					375					380			

	TCA GCC AAG TAC CTT GAG AAG AAA TTT AAC AAA TCA GAA AAA TAT ATC	1321
	Ser Ala Lys Tyr Leu Glu Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu Lys Tyr Ile	
	385 390 395	
5	TCA GAG AAC ATC CTT GTT CTG GAT ATA TTT TTT GAA GCT CTC AAT TAT	1369
	Ser Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Ala Leu Asn Tyr	
	400 405 410	
10	GAG ACA ATT GAA CAG AAG AAG GCG TAT GAA GTT GCT GCC TTA CTT GGT	1417
	Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Val Ala Ala Leu Leu Gly	
	415 420 425 430	
15	GAT ATT CGT GGT CAG ATG GGA TTG TTC ATT GGT GCT AGT ATC CTT ACA	1465
	Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr	
	435 440 445	
20	ATA CTA GAG CTC TTT GAT TAT ATT TAT GAG CTG ATC AAA GAG AAG CTA	1513
	Ile Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Tyr Glu Leu Ile Lys Glu Lys Leu	
	450 455 460	
25	TTA GAC CTG CTT GGC AAA GAG GAG GAT GAA GGG AGC CAC GAT GAG AAT	1561
	Leu Asp Leu Leu Gly Lys Glu Glu Asp Glu Gly Ser His Asp Glu Asn	
	465 470 475	
30	GTG AGT ACT TGT GAC ACA ATG CCA AAC CAC TCT GAA ACC ATC AGT CAC	1609
	Val Ser Thr Cys Asp Thr Met Pro Asn His Ser Glu Thr Ile Ser His	
	480 485 490	
35	ACT GTG AAC GTG CCC CTG CAG ACG ACC CTG GGG ACC CTG GAA GAA ATA	1657
	Thr Val Asn Val Pro Leu Gln Thr Thr Leu Gly Thr Leu Glu Glu Ile	
	495 500 505 510	
	GCC TGC TGA	1666
	Ala Cys *	
	512	

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:4 :

- i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
- 5 A) LONGUEUR : 3647 paires de base
- B) TYPE : acide nucléique
- C) NOMBRE DE BRINS : double
- D) CONFIGURATION : linéaire
- ii) TYPE DE MOLECULE : ADN
- 10 vi) ORIGINE : rat
- ix) CARACTERISTIQUE
- A) NOM/CLE : ASIC1B
- B) LOCALISATION : 109 .. 1785
- 15 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:4 :

```

CTGCCACAGA GGCTCTGGTG AGGAAGGACA GACAGCTGGA CCGGCGCAGA CCTAGCCGAA      60
20 GTCCAACCTC CGTCCCTTCT GGTGGCTTCT TCCTGTCTCC TGAACAAG ATG CCC ATC      117
                               Met Pro Ile
                               1       3

CAG ATC TTT TGT TCT GTG TCA TTC TCC TCT GGA GAG GAG GCC CCG GGA      165
25 Gln Ile Phe Cys Ser Val Ser Phe Ser Ser Gly Glu Glu Ala Pro Gly
   5                               10                               15

TCC ATG GCA GAT ATC TGG GGT CCC CAC CAC CAC CGG CAG CAG CAG GAC      213
30 Ser Met Ala Asp Ile Trp Gly Pro His His His Arg Gln Gln Gln Asp
   20                               25                               30                               35

AGC TCA GAA TCG GAA GAA GAG GAA GAG AAG GAA ATG GAG GCA GGG TCG      261
   Ser Ser Glu Ser Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Met Glu Ala Gly Ser
                               40                               45                               50

GAG TTG GAT GAG GCT GAT GAC TCA CCT AGG GAC TTG GTG GCC TTC GCC      309
   Glu Leu Asp Glu Gly Asp Asp Ser Pro Arg Asp Leu Val Ala Phe Ala
   55                               60                               65

AAC AGC TGT ACC TTC CAT GGT GCC AGC CAT GTG TTT GTG GAA GGG GGC      357
40 Asn Ser Cys Thr Phe His Gly Ala Ser His Val Phe Val Glu Gly Gly
   70                               75                               80

CCA GGG CCA AGG CAG GCC TTA TGG GCA GTG GCC TTT GTC ATA GCA CTG      405
45 Pro Gly Pro Arg Gln Ala Leu Trp Ala Val Ala Phe Val Ile Ala Leu
   85                               90                               95

GGT GCC TTC CTG TGC CAG GTA GGG GAC CGC GTT GCT TAT TAC CTC AGC      453
50 Gly Ala Phe Leu Cys Gln Val Gly Asp Arg Val Ala Tyr Tyr Leu Ser
  100                               105                               110                               115

TAC CCA CAC GTG ACT TTG CTA GAC GAA GTG GCC ACC ACG GAG CTG GTC      501
   Tyr Pro His Val Thr Leu Leu Asp Glu Val Ala Thr Thr Glu Leu Val
   120                               125                               130
55

```

	TTC CCA GCT GTC ACC TTC TGC AAC ACC AAT GCC GTG CCG TTG TCC CAG	549
	Phe Pro Ala Val Thr Phe Cys Asn Thr Asn Ala Val Arg Leu Ser Gln	
	135 140 145	
5	CTC AGC TAC CCT GAC TTG CTC TAC CTG GCC CCC ATG CTA GGA CTG GAT	597
	Leu Ser Tyr Pro Asp Leu Leu Tyr Leu Ala Pro Met Leu Gly Leu Asp	
	150 155 160	
10	GAG AGT GAT GAC CCC GGG GTG CCC CTT GCT CCT CCT GGC CCA GAG GCT	645
	Glu Ser Asp Asp Pro Gly Val Pro Leu Ala Pro Pro Gly Pro Glu Ala	
	165 170 175	
15	TTC TCC GGG GAG CCT TTT AAC CTC CAT CGT TTC TAT AAT CGC TCT TGC	693
	Phe Ser Gly Glu Pro Phe Asn Leu His Arg Phe Tyr Asn Arg Ser Cys	
	180 185 190 195	
20	CAC CGG CTG GAG GAC ATG CTG CTC TAT TGT TCC TAC TGT GGG GGC CCC	741
	His Arg Leu Glu Asp Met Leu Leu Tyr Cys Ser Tyr Cys Gly Gly Pro	
	200 205 210	
25	TGT GGT CCC CAC AAC TTC TCA GTG GTC TTC ACT CGG TAT GGG AAG TGT	789
	Cys Gly Pro His Asn Phe Ser Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys	
	215 220 225	
30	TAC ACA TTC AAC TCG GGC CAA GAT GGG CGG CCA CGG CTG AAG ACC ATG	837
	Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met	
	230 235 240	
35	AAA GGT GGG ACT GGC AAT GGC CTG GAG ATC ATG CTG GAC ATT CAG CAA	885
	Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln	
	245 250 255	
40	GAT GAA TAT TTG CCT GTG TGG GGA GAG ACC GAC GAG ACA TCC TTC GAA	933
	Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu	
	260 265 270 275	
45	GCA GGC ATC AAA GTG CAG ATC CAC AGT CAG GAT GAA CCC CCT TTC ATC	981
	Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu Pro Pro Phe Ile	
	280 285 290	
50	GAC CAG CTG GGC TTT GGT GTG GCT CCA GGT TTC CAG ACG TTT GTG TCT	1029
	Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln Thr Phe Val Ser	
	295 300 305	
55	TGC CAG GAG CAG AGG CTC ATC TAC CTG CCC TCA CCC TGG GGC ACC TGC	1077
	Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp Gly Thr Cys	
	310 315 320	
60	AAT GCT GTT ACC ATG GAC TCG GAT TTC TTC GAC TCC TAC AGC ATC ACT	1125
	Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser Ile Thr	
	325 330 335	
65	GCC TGC CCG ATT GAT TGC GAG ACG CGT TAC CTG GTG GAG AAC TGC AAC	1173
	Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn	
	340 345 350 355	

	TGC CGT ATG GTG CAC ATG CCA GGG GAC GCC CCA TAC TGC ACT CCA GAG	1221
	Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu	
	360 365 370	
5	CAG TAC AAG GAG TGT GCA GAT CCT GCC CTG GAC TTC CTA GTG GAG AAA	1269
	Gln Tyr Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys	
	375 380 385	
10	GAC CAG GAA TAC TGC GTG TGT GAG ATG CCT TGC AAC CTG ACC CGC TAC	1317
	Asp Gln Glu Tyr Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr	
	390 395 400	
15	GGC AAG GAG CTG TCC ATG GTC AAG ATC CCA AGC AAA GCC TCC GCC AAG	1365
	Gly Lys Glu Leu Ser Met Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys	
	405 410 415	
20	TAC CTG GCC AAG AAG TTC AAC AAA TCG GAG CAG TAC ATA GGG GAG AAC	1413
	Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn	
	420 425 430 435	
25	ATT CTG GTC CTG GAC ATT TTC TTT GAA GTC CTC AAC TAT GAG ACC ATC	1461
	Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val Leu Asn Tyr Glu Thr Ile	
	440 445 450	
30	GAG CAG AAA AAG GCC TAT GAG ATC GCA GGG CTG TTG GGT GAC ATC GGG	1509
	Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu Gly Asp Ile Gly	
	455 460 465	
35	GGC CAG ATG GGG TTG TTC ATC GGT GCC AGC ATC CTC ACC GTG CTG GAA	1557
	Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val Leu Glu	
	470 475 480	
40	CTC TTT GAC TAT GCC TAC GAG GTC ATT AAG CAC AGG CTG TGC AGA CGT	1605
	Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu Cys Arg Arg	
	485 490 495	
45	GGA AAG TGC CAG AAG GAG GCT AAG AGG AGC AGC GCA GAC AAG GGC GTG	1653
	Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val	
	500 505 510 515	
50	GCG CTC AGC CTG GAT GAC GTC AAA AGA CAC AAT CCC TGC GAG AGC CTC	1701
	Ala Leu Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu	
	520 525 530	
55	CGA GGA CAT CCT GCC GGG ATG ACG TAC GCT GCC AAC ATC CTA CCT CAC	1749
	Arg Gly His Pro Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Pro His	
	535 540 545	
60	CAT CCC GCT CGA GGC ACG TTT GAG GAC TTT ACC TGC TAA GCCCTCGCAG	1798
	His Pro Ala Arg Gly Thr Phe Glu Asp Phe Thr Cys *	
	550 555 559	
65	CCCCTGTAC CAAAGGCCTA GGTGGGGAGG GCTGGGGGAG CAAGGGGCCC CCAACTGCCC	1858
70	CCAGCTACCC TGTGGACTTA ACTGCATTCC TGGTCAGTGG TTCCCTCTTG TCTGTGGTGA	1918
75	GAAAGGAGTC TTGACCATAG AGTCCTCTCC CAGCCTCTAT CCCATCTTTT TATTTTAATT	1978
80	TAATCACATT TGCTCTGTAA TATTGCTTGA GGCTGGGGAT CGTGATTTC CCCCAGTTCT	2038

	TTTATGTGTTG AGAATAGTTT TCTCTATTCT GGGTTTTCTG TTATTTCAAA TGAATCTGCA	2098
	AATTGCTCTT CCCATCTCTA TGAAGAATTG CCGTGGAAAT TTGATGGGGA TTGTATTGAA	2158
5	TCTGTAGATT GCCTTTGGTA AGATGGCCAT TTTTACTATG TTAATCCTGC CAATTCATGA	2218
	GCAAGGGAGA TCTTTCTATC TCTGAAATCT ACTTCAGTTT CTTTCTTCAG AGACTTGAAG	2278
	TTCTTGTCAT AAAAATCTTT TTGGTTAGAG CCACACCAAG GTATTTTATA TTGTTTGTGA	2338
10	CTATTGTGAA TGGTGTCAAT TCCCTAATTT CCTTCTCAGC CTAATTATCC TTTGAGTAGA	2398
	GGAAGGCTTC TGATTTGTTT GGGTTAATTT TATACCCAGC TGCTTTGCTA AAGTTCTTTA	2458
15	TCAGGTTTAG GTGTTCTCTG GTGGAACCTT TGGGGTCACG TAAGAATACT ATTATATCAT	2518
	CTGCAAAATAG TGATATTTCA CTCTTCCTT TCCAATTTCT ATCCCTCTGG GGAATTTTGT	2578
	TTGTCTAATT GCTCTGGCTA GGAATTTCAA TTCTATATTG AATAGATAGG GAGAGAGTGG	2638
20	GCAGCCTTGT CTAGTTCCCTG GTTTTCGTGG GATCGCTTCA AATTTCTCTC CATTTAGTTT	2698
	GATATTGGCT ACTGGTTTGC TGTATATGCC TTTTACTGTA CTTAGGTATG GGCCTTGAAT	2758
25	TCCTGATATT TCCAAGACTT TTAACATGAA GGGGTTTTGA AATTTGCCAA ATGCTTTCTC	2818
	AGCATCTAAT GAGATGATCA TGTGCCCTCC CCCCACCTTG AGTTTGTTTA TATAGTGGGT	2878
	TACATGAAAG GATCATTCTT AATAGTCCAC AAGTCTGCCA AATCTTGCTG ATTGTGACTC	2938
30	ATTTCCATAG CAGGCTCTAT AACTTCTCTA ACAGATTGCA TTAAACTCTG CTTGGGGAAG	2998
	GCATTACCTC TTGGTTGAAG CAATGTTGTA GTTTCTATGC CTGCTGAGTA AATAGCCTCA	3058
35	AGTCCAAGTA CTTGCCCAGA CTAATGATCA AACGTATCCA GGAGTTCCAT ACCAGAGATG	3118
	TACTCTTCTC TCCTTTGAAG TACATTGCTG GAAGAGTAAT TGTGTTTGCT AGAGATACTC	3178
	CTTCGAACTG CAAAAGAAAT CTCTTGCTA AGCATATAAT CAAGCCTCAG GTTTTCTTTT	3238
40	TATTAAATAG CTGCTTGTA GAAAGTGGAC ACTAAGCATA TACCTCAAAG GGAGACAGAA	3298
	TGACTCTGTG CCTTCACTGA TGGAAGTCTG GGTACAAAT TACATCAGAA GAACCTATCA	3358
45	TAGTGAAACA TCTCATTCCC CTGGTATAAT CCCTTCTAGA AATACACTTG TGACTCTGAA	3418
	ATGTTATAAT CGTGACAACT AGGCTGTTAC AGATACACCA AGTTAAATTT GATAGAGAAA	3478
	CCAGGCTTGG AGCCTCATGT CCATAGGGCA AGAGGAAGAT GCTGAGTGTT TAAGGTTGGT	3538
50	TTGAGCGAAG AACCAATACCT TGTGTCACAA AAATGAAAGG AAAAAAGAAA AAAGGAAAGA	3598
	AGGAAAGAAA GAGAGAGAAA GAAAAAGAAA GAAAGAAAAA AAAAAAAA	3647

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:5 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

5 A) LONGUEUR 1602 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

10 vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : DRASIC

B) LOCALISATION : 1 .. 1602

15 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:5 :

20	ATG AAA CCT CGC TCC GGA CTG GAG GAG GCC CAG CGG CGA CAG GCC TCA	48
	Met Lys Pro Arg Ser Gly Leu Glu Glu Ala Gln Arg Arg Gln Ala Ser	
	1 5 10 15	
25	GAC ATC CGG GTG TTT GCC AGC AGC TGC ACA ATG CAT GGT CTG GGC CAC	96
	Asp Ile Arg Val Phe Ala Ser Ser Cys Thr Met His Gly Leu Gly His	
	20 25 30	
30	ATC TTT GGC CCT GGA GGC CTG ACC CTG CGC CGA GGG CTG TGG GCC ACA	144
	Ile Phe Gly Pro Gly Gly Leu Thr Leu Arg Arg Gly Leu Trp Ala Thr	
	35 40 45	
35	GCT GTG CTC CTG TCG CTG GCG GCC TTC CTC TAC CAG GTG GCT GAG CGG	192
	Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Tyr Gln Val Ala Glu Arg	
	50 55 60	
40	GTT CGC TAC TAT GGG GAG TTC CAC CAT AAG ACC ACC CTG GAT GAG CGT	240
	Val Arg Tyr Tyr Gly Glu Phe His His Lys Thr Thr Leu Asp Glu Arg	
	65 70 75 80	
45	GAG AGC CAC CAG CTC ACC TTC CCA GCT GTG ACT CTG TGT AAT ATC AAC	288
	Glu Ser His Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Ile Asn	
	85 90 95	
50	CCA CTG CGC CGC TCA CGC CTC ACA CCC AAT GAC TTG CAC TGG GCT GGA	336
	Pro Leu Arg Arg Ser Arg Leu Thr Pro Asn Asp Leu His Trp Ala Gly	
	100 105 110	
55	ACA GCG CTG CTG GGC CTG GAC CCT GCT GAA CAT GCT GCC TAC CTT CGT	384
	Thr Ala Leu Leu Gly Leu Asp Pro Ala Glu His Ala Ala Tyr Leu Arg	
	115 120 125	
60	GCA CTG GGC CAG CCC CCC GCA CCA CCT GGC TTC ATG CCC AGT CCG ACC	432
	Ala Leu Gly Gln Pro Pro Ala Pro Pro Gly Phe Met Pro Ser Pro Thr	
	130 135 140	
65	TTT GAC ATG GCA CAA CTC TAC GCC AGA GCC GGC CAC TCC CTT GAG GAC	480
	Phe Asp Met Ala Gln Leu Tyr Ala Arg Ala Gly His Ser Leu Glu Asp	
	145 150 155 160	



	ATG TTG TTG GAT TGC CGA TAC CGT GGC CAG CCC TGT GGG CCT GAG AAC	528
	Met Leu Leu Asp Cys Arg Tyr Arg Gly Gln Pro Cys Gly Pro Glu Asn	
	165 170 175	
5	TTC ACA GTG ATC TTT ACT CGA ATG GGG CAA TGC TAC ACC TTC AAC TCT	576
	Phe Thr Val Ile Phe Thr Arg Met Gly Gln Cys Tyr Thr Phe Asn Ser	
	180 185 190	
10	GGT GCC CAC GGT CCA GAG CTG CTC ACC ACT CCA AAG GGT GGT GCT GGC	624
	Gly Ala His Gly Ala Glu Leu Leu Thr Thr Pro Lys Gly Gly Ala Gly	
	195 200 205	
15	AAC GGA CTG GAG ATT ATG CTA GAT GTA CAG CAA GAG GAG TAT CTG CCC	672
	Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Val Gln Gln Glu Glu Tyr Leu Pro	
	210 215 220	
20	ATC TGG AAG GAC ATG GAA GAG ACC CCG TTT GAG GTG GGG ATC CGA GTG	720
	Ile Trp Lys Asp Met Glu Glu Thr Pro Phe Glu Val Gly Ile Arg Val	
	225 230 235 240	
25	CAG ATT CAC AGC CAG GAT GAG CCC CCT GCC ATT GAC CAG CTG GGC TTC	768
	Gln Ile His Ser Gln Asp Glu Pro Pro Ala Ile Asp Gln Leu Gly Phe	
	245 250 255	
30	GGG GCA GCC CCA GGC CAT CAG ACT TTT GTG TCC TGT CAG CAG CAG CAA	816
	Gly Ala Ala Pro Gly His Gln Thr Phe Val Ser Cys Gln Gln Gln Gln	
	260 265 270	
35	CTG AGT TTC CTG CCA CCA CCC TGG GGT GAC TGC AAT ACC GCA TCT TTG	864
	Leu Ser Phe Leu Pro Pro Pro Trp Gly Asp Cys Asn Thr Ala Ser Leu	
	275 280 285	
40	GAT CCC GAC GAC TTT GAT CCA GAG CCC TCT GAT CCC TTG GGT TCC CCC	912
	Asp Pro Asp Asp Phe Asp Pro Glu Pro Ser Asp Pro Leu Gly Ser Pro	
	290 295 300	
45	AGA CCC AGA CCC AGC CCT CCT TAT AGT TTA ATA GGT TGT CGC CTG GCC	960
	Arg Pro Arg Pro Ser Pro Pro Tyr Ser Leu Ile Gly Cys Arg Leu Ala	
	305 310 315 320	
50	TGT GAG TCT CGC TAT GTG GCT CGG AAG TGT GGC TGT CGA ATG ATG CAT	1008
	Cys Glu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Lys Cys Gly Cys Arg Met Met His	
	325 330 335	
55	ATG CCT GGA AAC TCC CCA GTG TGC AGC CCC CAG CAG TAC AAG GAC TGC	1056
	Met Pro Gly Asn Ser Pro Val Cys Ser Pro Gln Gln Tyr Lys Asp Cys	
	340 345 350	
60	GCC AGC CCA GCT CTG GAC GCT ATG CTG CGA AAG GAC ACG TGT GTC TGC	1104
	Ala Ser Pro Ala Leu Asp Ala Met Leu Arg Lys Asp Thr Cys Val Cys	
	355 360 365	
65	CCC AAC CCG TGC GCT ACT ACA CGC TAT GCC AAG GAG CTC TCC ATG GTG	1152
	Pro Asn Pro Cys Ala Thr Arg Tyr Ala Lys Glu Leu Ser Met Val	
	370 375 380	
70	CGG ATT CCC AGC CGC GCG TCA GCT CGC TAC CTG GCC CGG AAA TAC AAC	1200
	Arg Ile Pro Ser Arg Ala Ser Ala Arg Tyr Leu Ala Arg Lys Tyr Asn	
	385 390 395 400	

	CGC AGC GAG TCC TAC ATT ACG GAG AAT GTA CTG GTT CTG GAT ATC TTC	1248
	Arg Ser Glu Ser Tyr Ile Thr Glu Asn Val Leu Val Leu Asp Ile Phe	
	405 410 415	
5	TTT GAG GCC CTC AAC TAT GAA GCG GTG GAA CAA AAG GCG GCC TAT GAA	1296
	Phe Glu Ala Leu Asn Tyr Glu Ala Val Glu Gln Lys Ala Ala Tyr Glu	
	420 425 430	
10	GTG TCG GAG CTG CTG GGA GAC ATT GGG GGA CAG ATG GGA CTG TTT ATT	1344
	Val Ser Glu Leu Leu Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile	
	435 440 445	
15	GGA GCA AGC CTG CTT ACC ATC CTT GAG ATC CTC GAC TAT CTC TGT GAG	1392
	Gly Ala Ser Leu Leu Thr Ile Leu Glu Ile Leu Asp Tyr Leu Cys Glu	
	450 455 460	
20	GTT TTC CAA GAC AGA GTC CTG GGG TAT TTC TGG AAC AGA AGG AGC GCT	1440
	Val Phe Gln Asp Arg Val Leu Gly Tyr Phe Trp Asn Arg Arg Ser Ala	
	465 470 475 480	
	CAA AAG CGC TCT GGC AAC ACT CTG CTC CAG GAA GAG TTG AAT GGC CAT	1488
	Gln Lys Arg Ser Gly Asn Thr Leu Leu Gln Glu Glu Leu Asn Gly His	
	485 490 495	
25	CGA ACA CAT GTT CCC CAC CTC AGC CTA GGG CCC AGG CCT CCT ACC ACT	1536
	Arg Thr His Val Pro His Leu Ser Leu Gly Pro Arg Pro Pro Thr Thr	
	500 505 510	
30	CCC TGT GCT GTC ACC AAG ACA CTC TCT GCC TCC CAC CGT ACC TGT TAC	1584
	Pro Cys Ala Val Thr Lys Thr Leu Ser Ala Ser His Arg Thr Cys Tyr	
	515 520 525	
35	CTC GTC ACA AGG CTC TAG	1602
	Leu Val Thr Arg Leu *	
	530 533	

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:6 :

- i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE :
- 5 A) LONGUEUR 1948 paires de base
- B) TYPE : acide nucléique
- C) NOMBRE DE BRINS : double
- D) CONFIGURATION : linéaire

- ii) TYPE DE MOLECULE : ADN
- 10 vi) ORIGINE : rat

- ix) CARACTÉRISTIQUE
- A) NOM/CLE : MDEG2
- B) LOCALISATION : 16 .. 1707

- 15 xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE : SEQ ID NO:6 :

	CCTCGGGCTG AATGA ATG AGC CGG AGC GGC GGA GCC CGG CTG CCC GCG ACC	51
	Met Ser Arg Ser Gly Gly Ala Arg Leu Pro Ala Thr	
20	1 5 10	
	GCG CTC AGC GGC CCG GGA CGC TTC CGT ATG GCC CGC GAG CAG CCG GCG	99
	Ala Leu Ser Gly Pro Gly Arg Phe Arg Met Ala Arg Glu Gln Pro Ala	
	15 20 25	
25	CCC GTG GCG GTG GCG GCA GCT AGG CAG CCC GGA GGA GAC CGG AGC GGC	147
	Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Arg Gln Pro Gly Gly Asp Arg Ser Gly	
	30 35 40	
30	GAT CCG GCG CTG CAG GGG CCA GGG GTC GCC CGC AGG GGG CGG CCG TCC	195
	Asp Pro Ala Leu Gln Gly Pro Gly Val Ala Arg Arg Gly Arg Pro Ser	
	45 50 55 60	
35	CTG AGT CGC ACT AAA TTG CAC GGG CTG CGG CAC ATG TGC GCG GGG CGC	243
	Leu Ser Arg Thr Lys Leu His Gly Leu Arg His Met Cys Ala Gly Arg	
	65 70 75	
	ACG GCG GCG GGA GGC TCT TTC CAG CGA CGG GCG CTG TGG GTG CTG GCC	291
	Thr Ala Ala Gly Gly Ser Phe Gln Arg Arg Ala Leu Trp Val Leu Ala	
40	80 85 90	
	TTC TGC ACG TCC CTC GGC TTG CTG CTG TCC TGG TCC TCG AAC CGC CTG	339
	Phe Cys Thr Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ser Trp Ser Ser Asn Arg Leu	
	95 100 105	
45	CTC TAC TGG CTC AGC TTC CCG TCA CAC ACA CGA GTG CAC CGT GAG TGG	387
	Leu Tyr Trp Leu Ser Phe Pro Ser His Thr Arg Val His Arg Glu Trp	
	110 115 120	
50	AGC CGC CAG CTG CCG TTC CCC GCC GTC ACC GTG TGC AAC AAC AAC CCC	435
	Ser Arg Gln Leu Pro Phe Pro Ala Val Thr Val Cys Asn Asn Asn Pro	
	125 130 135 140	
55	CTG CGC TTC CCG CGC CTC TCC AAG GGG GAC CTC TAC TAC GCG GGC CAC	483
	Leu Arg Phe Pro Arg Leu Ser Lys Gly Asp Leu Tyr Tyr Ala Gly His	
	145 150 155	

	TGG	CTA	GGG	CTG	CTG	CTT	CCC	AAC	CGC	ACC	GGC	CGC	CCG	CTG	GTC	AGC	531
	Trp	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	
				160					165					170			
5	GAG	CTG	CTG	CGG	GGC	GAC	GAG	CCG	CGC	CGC	CAG	TGG	TTC	CGC	AAA	CTG	579
	Glu	Leu	Leu	Arg	Gly	Asp	Glu	Pro	Arg	Arg	Gln	Trp	Phe	Arg	Lys	Leu	
				175				180					185				
10	GCC	GAC	TTC	CGC	CTC	TTC	CTG	CCG	CCG	CGC	CAC	TTC	GAG	GGC	ATC	AGC	627
	Ala	Asp	Phe	Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Pro	Arg	His	Phe	Glu	Gly	Ile	Ser	
		190					195					200					
15	GCT	GCC	TTC	ATG	GAC	CGT	TTC	GGC	CAC	CAG	CTG	GAG	GAT	ATG	CTG	CTC	675
	Ala	Ala	Phe	Met	Asp	Arg	Leu	Gly	His	Gln	Leu	Glu	Asp	Met	Leu	Leu	
	205				210						215				220		
20	TCC	TGC	AAG	TAC	CGG	GGC	GAG	CTC	TGT	GGC	CCG	CAC	AAC	TTC	TCC	TCA	723
	Ser	Cys	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Cys	Gly	Pro	His	Asn	Phe		Ser	
				225						230				235			
	GTG	TTT	ACA	AAA	TAC	GGG	AAG	TGT	TAC	ATG	TTT	AAC	TCA	GGC	GAG	GAT	771
	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Tyr	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	
				240				245					250				
25	GGC	AAG	CCG	CTG	CTC	ACC	ACG	GTC	AAG	GGG	GGG	ACG	GGC	AAC	GGG	CTG	819
	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	
			255					260					265				
30	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	ATT	CAG	CAA	GAT	GAG	TAC	CTG	CCC	ATC	TGG	GGA	867
	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Trp	Gly	
		270					275					280					
35	GAG	ACA	GAG	GAA	ACA	ACG	TTT	GAA	GCA	GGA	GTG	AAG	GTT	CAG	ATC	CAC	915
	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Gln	Ile	His	
	285				290						295				300		
40	AGT	CAG	TCT	GAG	CCG	CCT	TTC	ATC	CAA	GAG	CTG	GGC	TTT	GGG	GTG	GCT	963
	Ser	Gln	Ser	Glu	Pro	Pro	Phe	Ile	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	
					305					310				315			
	CCG	GGG	TTC	CAG	ACC	TTC	GTG	GCC	ACA	CAA	GAG	CAG	AGG	CTC	ACA	TAT	1011
	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Thr	Tyr	
				320				325					330				
45	CTG	CCC	CCA	CCA	TGG	GGG	GAG	TGC	CGG	TCC	TCA	GAG	ATG	GGA	CTC	GAC	1059
	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	Gly	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	
			335					340					345				
50	TTC	TTT	CCT	GTT	TAC	AGC	ATC	ACA	GCC	TGT	CGG	ATT	GAC	TGT	GAG	ACC	1107
	Phe	Phe	Pro	Val	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	
		350					355					360					
55	CGC	TAC	ATC	GTG	GAG	AAC	TGT	AAC	TGC	CGC	ATG	GTC	CAC	ATG	CCA	GGG	1155
	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	
	365					370					375					380	

	GAC GCC CCT TTC TGC ACC CCT GAG CAG CAC AAG GAG TGT GCA GAG CCT	1203
	Asp Ala Pro Phe Cys Thr Pro Glu Gln His Lys Glu Cys Ala Glu Pro	
	385 390 395	
5	GCC CTC GGT CTA CTG GCA GAA AAG GAC AGC AAT TAC TGT CTC TGC AGG	1251
	Ala Leu Gly Leu Leu Ala Glu Lys Asp Ser Asn Tyr Cys Leu Cys Arg	
	400 405 410	
10	ACA CCC TGC AAC CTG ACA CGC TAC AAC AAA GAG CTC TCC ATG GTG AAG	1299
	Thr Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Asn Lys Glu Leu Ser Met Val Lys	
	415 420 425	
15	ATC CCC AGC AAG ACG TCA GCC AAG TAC TTA GAG AAG AAA TTT AAC AAA	1347
	Ile Pro Ser Lys Thr Ser Ala Lys Tyr Leu Glu Lys Lys Phe Asn Lys	
	430 435 440	
20	TCG GAA AAA TAT ATC TCA GAG AAC ATT CTT GTT CTG GAC ATA TTT TTT	1395
	Ser Glu Lys Tyr Ile Ser Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe	
	445 450 455 460	
25	GAG GCG CTC AAT TAC GAA ACA ATT GAA CAG AAG AAG GCG TAT GAA GTT	1443
	Glu Ala Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Val	
	465 470 475	
30	GCT GCC TTA CTT GGT GAC ATC GGT GGT CAG ATG GGA CTG TTC ATT GGT	1491
	Ala Ala Leu Leu Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly	
	480 485 490	
35	GCT AGT CTC CTC ACA ATA CTA GAG CTC TTT GAT TAT ATT TAT GAG CTG	1539
	Ala Ser Leu Leu Thr Ile Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Tyr Glu Leu	
	495 500 505	
40	ATC AAA GAG AAG CTA TTA GAC CTG CTT GGC AAA GAA GAA GAG GAA GGG	1587
	Ile Lys Glu Lys Leu Leu Asp Leu Leu Gly Lys Glu Glu Glu Glu Gly	
	510 515 520	
45	AGC CAC GAT GAG AAC ATG ACC ACC TGT GAC ACA ATG CCA AAC CAC TCT	1635
	Ser His Asp Glu Asn Met Ser Thr Cys Asp Thr Met Pro Asn His Ser	
	525 530 535 540	
50	GAA ACC ATC AGC CAC ACT GTG AAC GTG CCC CTG CAG ACA GCT TTG GGC	1683
	Glu Thr Ile Ser His Thr Val Asn Val Pro Leu Gln Thr Ala Leu Gly	
	545 550 555	
45	ACC CTG GAG GAG ATT GCC TGC TGA CACCTCTCAG GCAACGCAGC ACCTCCAAAC	1737
	Thr Leu Glu Glu Ile Ala Cys *	
	560 563	
50	AGACCTTAAA GGCCCAAGAC CTAGGACAGG AGACAGCAAG CGCAGGTGGG ATCGCCCCTG	1797
	ACGACTGAAA GAAGCAGAGC CCCCCATATG CACACATTGC GAACCTTCTGC CAAACCTCAC	1857
	CTGGCCACAT CTGACATGAA CCGTCCCGGG CCCTGCGTCA TGTCCCTCGC AGGACCGATG	1917
	AGTCGCACTC CGGAACCTGTC CAAGAACTAA C	1948

## REVENDICATIONS

5 1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons.

10 2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ IS No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15 3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

20 4) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou un dérivé fonctionnelllement équivalent de cette protéine.

25 5) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

30 6) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

35 7) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des

revendications 1 à 6 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé ou non par les protons.

5 8) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

10 9) Canal cationique hybride selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite première protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 5 et la seconde protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou SEQ ID No 6.

20 10) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et/ou contre au moins un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

25 11) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

30 12) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe

sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence complémentaire.

5                   13) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence complémentaire.

10                   14) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 127 et 1663 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe  
15                   sous le numéro SEQ ID No : 3, ou sa séquence complémentaire.

20                   15) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4, ou sa séquence complémentaire.

25                   16) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1602 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5, ou sa séquence  
30                   complémentaire.

35                   17) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, avantageusement associée à des séquences de contrôle.



18) Procédé de production d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 11 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 dans un hôte cellulaire,
- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,
- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

19) Procédé d'expression d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 11 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 dans ledit hôte cellulaire,
- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

20) Procédé selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

21) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride

et activés par les protons, obtenue par le procédé selon l'une des revendications 18 à 20.

5                   22) Procédé de criblage de substances  
capables de moduler l'activité de canaux ioniques  
neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en  
contact des quantités variables d'une substance à tester  
avec des cellules selon la revendication 21, puis l'on  
10 mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels  
de ladite substance sur les courants des canaux  
cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les  
protons.

15                   23) Procédé selon la revendication 22  
appliqué au criblage de substances capables de moduler la  
perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la  
nociception que la transduction du goût.

20                   24) Composition pharmaceutique comprenant  
comme principe actif au moins une protéine constituant un  
canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1  
à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque 7 à 9 ou  
encore un anticorps selon la revendication 10.

25                   25) Utilisation d'une substance chimique ou  
biologique capable de modifier les courants d'un canal  
ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6  
et/ou un canal hybride selon l'une quelconque des  
revendications 7 à 9 pour la préparation d'un médicament  
30 capable de moduler la perception de l'acidité, tant en ce  
qui concerne la nociception que la transduction du goût,  
chez un sujet humain ou animal.

1/9

Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro Val Ser Ile  
Pro Val Ser Ile

Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala His Ile Phe Ser Tyr  
Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met Ala His Ile Phe Ser Tyr

Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu  
Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu

Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His  
Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His

His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val  
His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val

Thr Leu Cys Asn Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu  
Thr Leu Cys Asn Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu

Tyr His Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp  
Tyr His Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp

Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe  
Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe

Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg Ala Gly  
Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg Ala Gly

His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly Glu Ala Cys Ser  
His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly Glu Val Cys Ser

Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn  
Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly Lys Cys Tyr Thr Phe Asn

Ser Gly Gln Asp Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn  
Ser Gly Arg Asn Gly Arg Pro Arg Leu Lys Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn

Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly  
Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly

Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln  
Glu Thr Asp Glu Thr Ser Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln

Asp Glu Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln  
Asp Glu Pro Pro Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln

**Fig. 1**

2/9

Thr Phe Val Ser Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Ser Pro Trp Gly  
Thr Phe Val Ala Cys Gln Glu Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Pro Pro Pro Trp Gly

Thr Cys Asn Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser  
Thr Cys Lys Ala Val Thr Met Asp Ser Asp Leu Asp Phe Phe Asp Ser Tyr Ser

Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn  
Ile Thr Ala Cys Arg Ile Asp Cys Glu Thr Arg Tyr Leu Val Glu Asn Cys Asn

Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr  
Cys Arg Met Val His Met Pro Gly Asp Ala Pro Tyr Cys Thr Pro Glu Gln Tyr

Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr  
Lys Glu Cys Ala Asp Pro Ala Leu Asp Phe Leu Val Glu Lys Asp Gln Glu Tyr

Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met  
Cys Val Cys Glu Met Pro Cys Asn Leu Thr Arg Tyr Gly Lys Glu Leu Ser Met

Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys  
Val Lys Ile Pro Ser Lys Ala Ser Ala Lys Tyr Leu Ala Lys Lys Phe Asn Lys

Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val  
Ser Glu Gln Tyr Ile Gly Glu Asn Ile Leu Val Leu Asp Ile Phe Phe Glu Val

Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu  
Leu Asn Tyr Glu Thr Ile Glu Gln Lys Lys Ala Tyr Glu Ile Ala Gly Leu Leu

Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val  
Gly Asp Ile Gly Gly Gln Met Gly Leu Phe Ile Gly Ala Ser Ile Leu Thr Val

Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Glu Val Ile Lys His Arg Leu Cys Arg Arg  
Leu Glu Leu Phe Asp Tyr Ala Tyr Gly Val Ile Lys His Lys Leu Cys Arg Arg

Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu  
Gly Lys Cys Gln Lys Glu Ala Lys Arg Ser Ser Ala Asp Lys Gly Val Ala Leu

Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro  
Ser Leu Asp Asp Val Lys Arg His Asn Pro Cys Glu Ser Leu Arg Gly His Pro

Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr  
Ala Gly Met Thr Tyr Ala Ala Asn Ile Val Pro His His Pro Ala Arg Gly Thr

Phe Glu Asp Phe Thr Cys  
Phe Glu Asp Phe Thr Cys

**Fig. 1 (suite)**

Fig.2

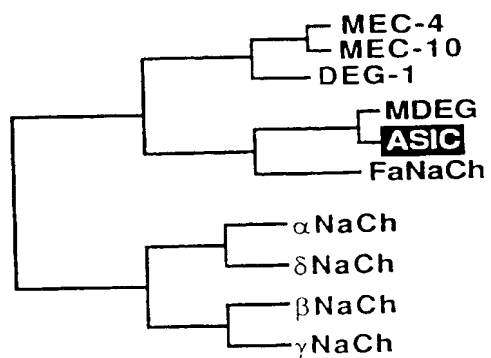
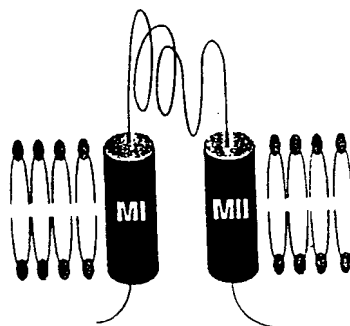
1	MSWMONLKNYOHLRDPSEYMSQVYGDPLAYLOENTKFVTEREYEDFYGECFNSSESEV	1	MYTSAAATKPGVFPPEHHOHAMMRNRYHPHHCNY
1	ASIC	1	ASIC
1	MDEG	1	MDEG
34	SDNRSA	34	SDNRSA
61	QCELITGE	61	QCELITGE
55	ALLCVC	55	ALLCVC
59	TAAT	59	TAAT
74	INLY	74	INLY
113	ALL	113	ALL
112	MDEG	112	MDEG
135	FA	135	FA
359		359	
146	S	146	S
145	H	145	H
168	G	168	G
419	T	419	T
198	NSG	198	NSG
197	NSG	197	NSG
212	NSG	212	NSG
479	N	479	N
254	EP	254	EP
253	EP	253	EP
268	SM	268	SM
536	DE	536	DE

4/9

Fig.2 (SUITE)

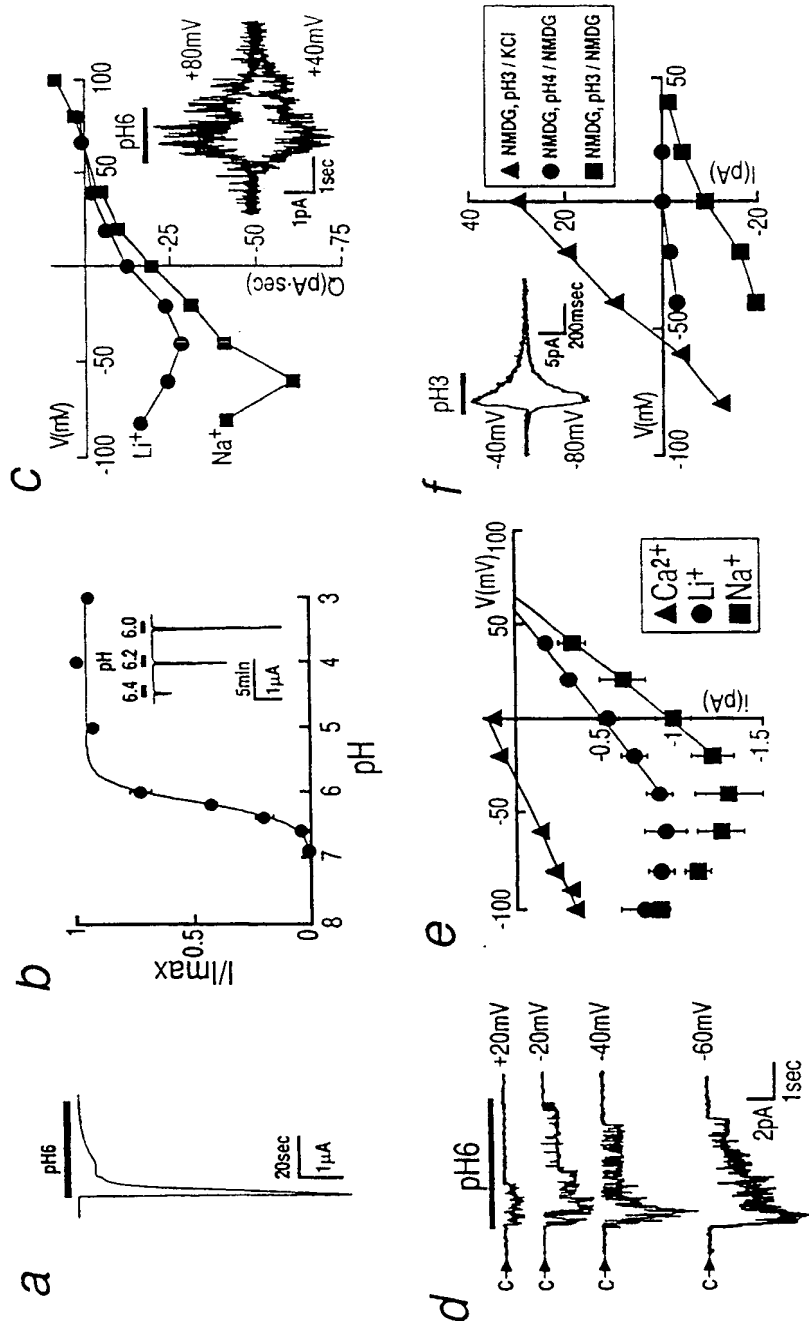
ASIC	311	DCETRYLV	ENCHNC	RMVHM	PGDAP	CTPEQ
MDEG	310	DCETRYLV	ENCHNC	RMVHM	PGDAP	CTPEQ
FaNaCh	315	LCKORLI	IRCGG	ESSA	PEVPS	NATFCGV
MEC-4	586	SCFQOL	IRCGG	ESSA	PEVPS	NATFCGV
ASIC	340	YKECA	DPAL	DF	LV	EKD
MDEG	339	HKECA	DPAL	DF	LV	EKD
FaNaCh	385	YLA	CEERE	OKN	LN	NDRT
MEC-4	622	CLDA	RMND	LG	LG	LG
ASIC	381	SKSAKY	LAKK	FNK	SE	Q
MDEG	380	SKSAKY	LAKK	FNK	SE	Q
FaNaCh	445	OAG	ONHFM	KTYE	VLE	KLA
MEC-4	670	OAG	ONHFM	KTYE	VLE	KLA
ASIC	404	LVLD	IFFE	V	LV	ET
MDEG	403	LVLD	IFFE	V	LV	ET
FaNaCh	505	LRNL	LVLE	DL	SV	VE
MEC-4	687	LRNL	LVLE	DL	SV	VE
ASIC	464	CRGK	COKE	EA	KRSS	AD
MDEG	463	CRGK	COKE	EA	KRSS	AD
FaNaCh	565	NSEK	GLP	PG	PT	T
MEC-4	747	NSEK	GLP	PG	PT	T

5 / 9

Fig. 3Fig. 4

6/9

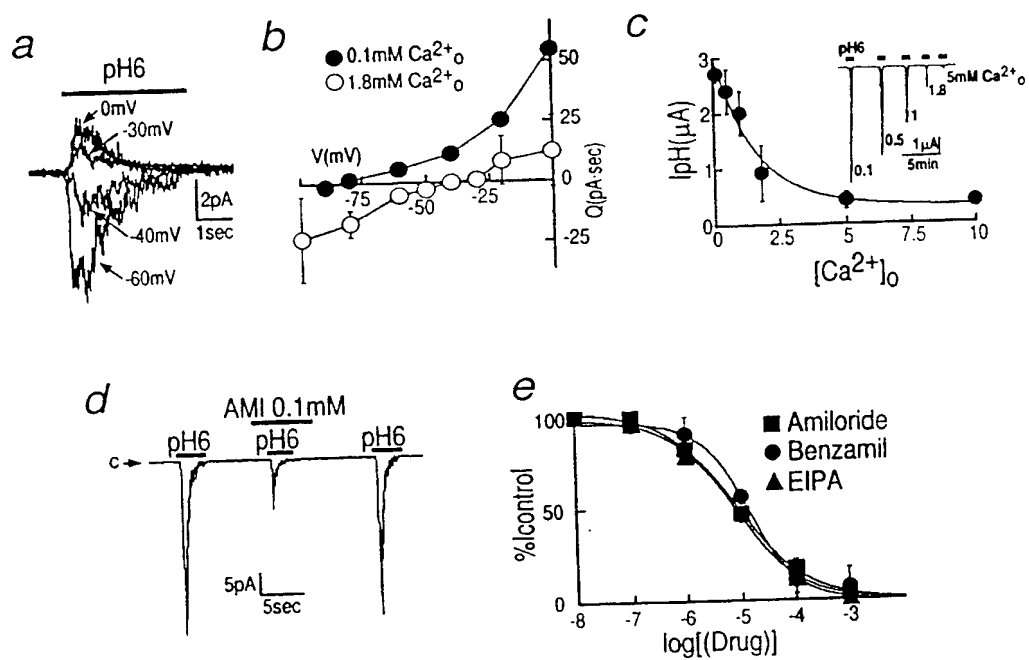
Fig.5





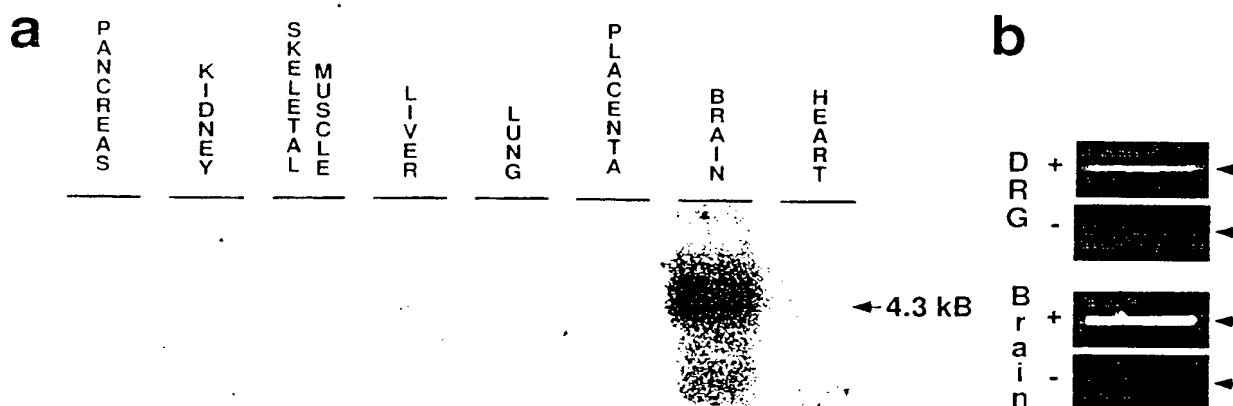
7/9

Fig.6



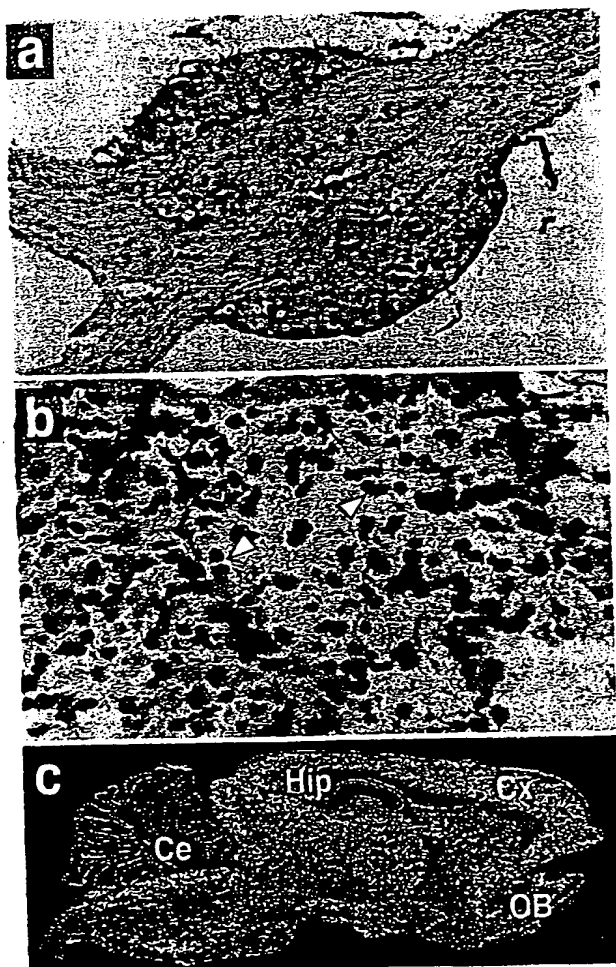
8/9

Fig. 7



9/9

Fig. 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. itional Application No

PCT/FR 98/00270

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 A61K38/17 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WALDMANN R ET AL: "THE MAMMALIAN DEGENERIN MDEG, AN AMILORIDE-SENSITIVE CATION CHANNEL ACTIVATED BY MUTATIONS CAUSING NEURODEGENERATION IN CAENORHABDITIS ELEGANS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 18, 3 May 1996, pages 10433-10436, XP002051361 cited in the application	1,4,11, 14,17-22
Y	see the whole document	23,25
X	COREY D P ET AL: "MECHANONSENSATION AND THE DEG/ENAC ION CHANNELS" SCIENCE, vol. 273, no. 5273, 19 July 1996, page 323/324 XP002051360 see the whole document	1,3,11, 13, 17-22,24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

" Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 1998

Date of mailing of the international search report

16/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/FR 98/00270

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GILBERTSON, TIMOTHY A. ET AL: "Proton currents through amiloride-sensitive sodium channels in isolated hamster taste cells: Enhancement by vasopressin and cAMP" NEURON (1993), 10(5), 931-42 CODEN: NERNET; ISSN: 0896-6273, XP002068540 see page 938 - page 939 ---	1,10,11, 17-25
Y	PRICE MP ET AL: "Cloning and expression of a novel human brain Na <sup>+</sup> channel." J BIOL CHEM, APR 5 1996, 271 (14) P7879-82, UNITED STATES, XP002068541 see the whole document ---	1,10,11, 17-22,24
A	EMBL databank Accession number w62694 09-JUN-1996 Marra M et al. XP002068546 cited in the application see the whole document ---	1,11, 17-22,24
A	AKAIKE N ET AL: "Proton-induced current in neuronal cells." PROG NEUROBIOL, MAY 1994, 43 (1) P73-83, ENGLAND, XP002068567 see the whole document ---	1,2, 10-12, 17-24
P,X	WALDMANN R ET AL: "A proton-gated cation channel involved in acid-sensing." NATURE, MAR 13 1997, 386 (6621) P173-7, ENGLAND, XP002068589 see the whole document ---	1,2, 10-12, 17-25
P,X	BASSILANA F ET AL: "The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H <sup>+</sup> -gated Na <sup>+</sup> channel with novel properties." J BIOL CHEM, NOV 14 1997, 272 (46) P28819-22, UNITED STATES, XP002068543 see the whole document ---	1,2, 10-12, 17-25
P,X	LINGUEGLIA E ET AL: "A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells." J BIOL CHEM, NOV 21 1997, 272 (47) P29778-83, XP002068544 see the whole document ---	1,2, 10-12, 17-25

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .tional Application No

PCT/FR 98/00270

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>BARBRY P ET AL: "Molecular biology of Na<sup>+</sup> absorption."</p> <p>AM J PHYSIOL, SEP 1997, 273 (3 PT 1)</p> <p>PG571-85, UNITED STATES, XP002068545</p> <p>see page 573, right-hand column, paragraph 2 - page 576, left-hand column, paragraph 2</p>	<p>1,2,4,</p> <p>10-12,</p> <p>14,17-25</p>
P,X	<p>-----</p> <p>GARCIA-ANOVEROS J ET AL: "BNAC1 AND BNAC2 CONSTITUTE A NEW FAMILY OF HUMAN NEURONAL SODIUM CHANNELS RELATED TO DEGENERINS AND EPITHELIAL SODIUM CHANNELS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,</p> <p>vol. 94, no. 4, 18 February 1997,</p> <p>pages 1459-1464, XP002051359</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1,3,4,</p> <p>11,13,</p> <p>14,</p> <p>17-22,25</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. de Internationale No

PCT/FR 98/00270

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 A61K38/17 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WALDMANN R ET AL: "THE MAMMALIAN DEGENERIN MDEG, AN AMILORIDE-SENSITIVE CATION CHANNEL ACTIVATED BY MUTATIONS CAUSING NEURODEGENERATION IN CAENORHABDITIS ELEGANS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 18, 3 mai 1996, pages 10433-10436, XP002051361 cité dans la demande	1, 4, 11, 14, 17-22
Y	voir le document en entier	23, 25
X	COREY D P ET AL: "MECHANOSENSATION AND THE DEG/ENAC ION CHANNELS" SCIENCE, vol. 273, no. 5273, 19 juillet 1996, page 323/324 XP002051360 voir le document en entier	1, 3, 11, 13, 17-22, 24

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 juillet 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/07/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GILBERTSON, TIMOTHY A. ET AL: "Proton currents through amiloride-sensitive sodium channels in isolated hamster taste cells: Enhancement by vasopressin and cAMP" NEURON (1993), 10(5), 931-42 CODEN: NERNET; ISSN: 0896-6273, XP002068540 voir page 938 - page 939 ---	1, 10, 11, 17-25
Y	PRICE MP ET AL: "Cloning and expression of a novel human brain Na <sup>+</sup> channel." J BIOL CHEM, APR 5 1996, 271 (14) P7879-82, UNITED STATES, XP002068541 voir le document en entier ---	1, 10, 11, 17-22, 24
A	EMBL databank Accession number w62694 09-JUN-1996 Marra M et al. XP002068546 cité dans la demande voir le document en entier ---	1, 11, 17-22, 24
A	AKAIKE N ET AL: "Proton-induced current in neuronal cells." PROG NEUROBIOL, MAY 1994, 43 (1) P73-83, ENGLAND, XP002068567 voir le document en entier ---	1, 2, 10-12, 17-24
P, X	WALDMANN R ET AL: "A proton-gated cation channel involved in acid-sensing." NATURE, MAR 13 1997, 386 (6621) P173-7, ENGLAND, XP002068589 voir le document en entier ---	1, 2, 10-12, 17-25
P, X	BASSILANA F ET AL: "The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H <sup>+</sup> -gated Na <sup>+</sup> channel with novel properties." J BIOL CHEM, NOV 14 1997, 272 (46) P28819-22, UNITED STATES, XP002068543 voir le document en entier ---	1, 2, 10-12, 17-25
P, X	LINGUEGLIA E ET AL: "A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells." J BIOL CHEM, NOV 21 1997, 272 (47) P29778-83, XP002068544 voir le document en entier ---	1, 2, 10-12, 17-25
	---	

-/--



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de internationale No  
PCT/FR 98/00270

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>BARBRY P ET AL: "Molecular biology of Na<sup>+</sup> absorption."  AM J PHYSIOL. SEP 1997, 273 (3 PT 1)  PG571-85, UNITED STATES, XP002068545  voir page 573, colonne de droite, alinéa 2  - page 576, colonne de gauche, alinéa 2  ---</p>	<p>1,2,4,  10-12,  14,17-25</p>
P,X	<p>GARCIA-ANOVEROS J ET AL: "BNAC1 AND BNAC2  CONSTITUTE A NEW FAMILY OF HUMAN NEURONAL  SODIUM CHANNELS RELATED TO DEGENERINS AND  EPITHELIAL SODIUM CHANNELS"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF  SCIENCES OF USA,  vol. 94, no. 4, 18 février 1997,  pages 1459-1464, XP002051359  voir le document en entier  -----</p>	<p>1,3,4,  11,13,  14,  17-22,25</p>

